

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



**LIMONINA EM CITRINOS: ANÁLISE, BIOCONVERSÃO E
BIOACTIVIDADE**

Susana Isabel Coelho Vieira da Silva

**MESTRADO EM
CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS**

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



LIMONINA EM CITRINOS: ANÁLISE, BIOCONVERSÃO E BIOACTIVIDADE

Susana Isabel Coelho Vieira da Silva

Dissertação orientada por:

- Prof. Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro
- Prof. Doutora Suzana Ferreira-Dias

**MESTRADO EM
CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS**

2010

Resumo

Os citrinos são aceites pelo seu valor nutritivo e medicinal, assim como por providenciarem um sabor característico a uma grande variedade de produtos alimentares, o que lhes confere uma ampla aceitação e popularidade no seio da indústria de produção alimentar. Contudo, um problema global na indústria dos citrinos é o desenvolvimento de um sabor amargo no sumo e produtos de citrinos após a extracção do sumo. O sabor amargo ocorre em algumas variedades de laranjas, toranjas e limões, com significativo impacto comercial negativo. A conversão da limonina monolactona a limonina tem sido referenciada como a principal razão para o desenvolvimento tardio do sabor amargo em sumos de citrinos.

Neste trabalho, o objectivo centrou-se na avaliação da remoção selectiva da limonina de sumo de laranja por adsorção a diferentes resinas poliméricas neutras e por formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas.

O método HPLC utilizado foi validado para o composto em estudo, através da aplicação de vários testes estatísticos, que permitiram definir o intervalo de linearidade, a gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão e a estimativa da incerteza do método de ensaio.

As resinas sintéticas neutras utilizadas foram as seguintes: Amberlite XAD-8, XAD-16N e XAD-1600. O estudo foi realizado em microescala. Os melhores resultados foram obtidos para a resina XAD-18 com valores de adsorção superior a 80 %.

Não se observou adsorção significativa de açúcares, pigmentos e vitamina C. Os modelos de isotérmicas de adsorção de Freundlich e Langmuir foram ajustados aos dados experimentais de adsorção da limonina às resinas utilizadas.

As ciclodextrinas são oligómeros cíclicos que têm vindo a ganhar grande aceitação por parte da indústria alimentar. A β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina foram testadas como método alternativo à remoção de compostos amargos de sumos e produtos de citrinos. A razão de 1:1 (Sumo:ciclodextrina) originou uma inclusão de 92,5 % e de 82 % de limonina

do sumo.

A limonina apresenta também um variado leque de actividades biológicas, principalmente actividade anti-inflamatória. Esta acção foi avaliada através da medição do edema induzido da pata do rato. A limonina complexada em ciclodextrinas originou uma redução do edema ($\approx 50\%$) semelhante no sumo processado e não processado.

Palavras-chave: adsorção, limonina, sumo de laranja, resinas sintéticas neutras, ciclodextrinas

Abstract

Citrus fruits are accepted for their nutritive and medicinal value as well as for providing distinctive flavor to a wide variety of food products, making it very popular among food product designers. However, a worldwide major problem in the citrus industry is the formation of bitterness in citrus juice and products after juice extraction. This bitterness occurs in certain varieties of oranges, grapefruits and lemons showing a significant negative commercial impact. The conversion of limonate-A-ring lactone into limonin has been reported as the reason for delayed bitterness of citrus juice. This reaction proceeds under acidic conditions below pH 6.5 and is accelerated by the enzyme limonin-D-ring lactone hydrolase. The presence of limonin and nomilin has been the main cause of delayed bitterness of citrus fruits.

In this work, the objective was to investigate the selective removal of limonin from orange juice by batch adsorption to different microstructured resins. Since the removal of reducing sugars, pigments and vitamin C may also occur, the eventual adsorption of these compounds was also investigated.

In addition, limonin presents a wide range of biological activities, mainly concerning anti-inflammatory properties. Limonin's anti-inflammatory ability was assayed by measurement of induced rat paw edema.

The used HPLC method was validated through the application of several statistical methods which allow defining the linearity range, working ranges, analytical limits, precision and the uncertainty estimation of the analytical assay for the studied compound.

The following synthetic neutral resins, were tested: Amberlite XAD-8, XAD-16N and XAD-1600. The experiments were performed in a microscale, using 24 wells microplates.

No significant adsorption of sugars, pigments and vitamin C to the resins was observed. Both Freundlich and Langmuir isotherm models were fitted to the experimental data of adsorption of limonin to the resins used. Cyclodextrins are cyclic oligomers that have been gaining wider acceptance in the food industry as food additives, for stabilization of flavours, for elimination of

undesired tastes or other undesired compounds, mainly due to their ability to form inclusion complexes. β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin were test as an alternative method to remove bitter compounds from citrus juice and products.

Keywords: adsorption, limonin, orange juice, synthetic neutral resins, cyclodextrins

Agradecimentos

À Prof. Doutora Maria Henriques L. Ribeiro, orientadora deste trabalho, quero agradecer a enorme dedicação, disponibilidade e apoio que contribuíram para a elaboração do presente trabalho e o empenho demonstrado na fase final de elaboração desta tese. Agradeço ainda o apoio ao longo de toda a fase de planeamento do trabalho experimental e da elaboração da tese, desde a organização da informação à correcção dos textos, assim como a confiança e amizade transmitida para ultrapassar os momentos mais difíceis.

À Prof. Doutora Suzana Ferreira-Dias, co-orientadora deste trabalho, agradeço a co-orientação do trabalho e revisão da tese.

À Prof. Doutora Matilde Castro, coordenadora do mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, pela simpatia que sempre demonstrou e apoio dado ao longo deste mestrado.

Ao Prof. Doutor José Cabrita e à Prof. Doutora Maria Manuel Lopes pela oferta das laranjas, do seu pomar a Sul de Portugal, e que foram imprescindíveis para a realização deste estudo.

À Prof. Doutora Cristina Almeida, por toda a simpatia demonstrada e pelos conhecimentos científicos transmitidos que permitiram a melhoria desta tese de Mestrado.

À Prof. Doutora Helena Marques, pela oferta das ciclodextrinas utilizadas neste trabalho e pelos conhecimentos que transmitiu nesta área.

Ao Dr. Hélder Vila-Real quero agradecer a valiosa partilha dos seus conhecimentos, pela disponibilidade que sempre demonstrou em ajudar, pela força que sempre me transmitiu, pela amizade e por nunca me ter deixado desanimar.

Ao Mestre João Rocha, pela preciosa ajuda dada na realização dos ensaios com os ratos, assim como pela enorme simpatia e disponibilidade que sempre demonstrou.

Aos meus colegas Pedro, Céu e Ana, pelo apoio e amizade que demonstraram ao longo de todo este tempo, e por me terem sempre incentivado a continuar.

Aos meus amigos, em especial ao Hélder, à Cláudia e ao Tiago, à Patrícia e ao Mário e à Vera e ao Carlos, por sempre me terem acompanhado e me terem dado ânimo em todas as fases deste trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais e ao meu irmão, a minha gratidão pelo imprescindível apoio e compreensão ao longo deste período e pela forma incondicional com que sempre caminharam ao meu lado, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Telmo, a quem dedico esta tese, por ter sido o meu “pilár”, por todo o carinho, compreensão, paciência e disponibilidade que sempre demonstrou, nunca me deixando perder o rumo.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Índice	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Símbolos e abreviaturas	xiii
1. Introdução e Objectivos	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Os citrinos: Frutos e Sumos	3
2.1.1. Frutos	4
2.1.2. Composição	7
2.1.3. Limonina	8
2.1.4. Bioactividade	12
2.2. Sumos de citrinos	15
2.2.1. Indústria – Sumos	16
2.2.2. Processamento	18
2.3. Supressão da limonina de sumos	22
2.3.1. Adsorção	22
2.3.2. Isotérmicas de Adsorção	26
2.3.3. Ciclodextrinas	28
2.3.3.1. Formação de complexos de inclusão	29
2.3.3.2. Aplicações das ciclodextrinas na encapsulação	30
2.3.3.3. Limitações e desvantagens	33
2.4. Validação de métodos analíticos	33
2.4.1. Especificidade/Selectividade	36
2.4.2. Curvas de calibração	37
2.4.3. Linearidade	38
2.4.4. Gama de Trabalho	39

4. Resultados e Discussão	64
4.1. Validação do método de HPLC para análise da limonina	64
4.1.1. Linearidade e gama de trabalho	64
4.1.2. Limites analíticos	68
4.1.3. Precisão	68
4.1.4. Recuperação	69
4.1.5. Análise de amostras de sumos	69
4.2. Supressão da limonina de sumos de laranja	71
4.2.1. Adsorção (XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18)	71
4.2.1.1. Influência do tempo de contacto	72
4.2.1.2. Efeito da concentração de resinas	77
4.2.1.3. Isotérmicas de adsorção	78
4.2.1.4. Factores de afinidade, factores de concentração e factores de separação	82
4.2.2. Complexação para inclusão em ciclodextrinas	83
4.3. Estudos de bioactividade e de comparabilidade do sumo de laranja antes e após o processamento por adsorção e por complexação	85
5. Conclusões e sugestões para trabalho futuro	90
Referências Bibliográficas	93
Anexos	100
Anexo 1 – Teste das Áreas Normalizadas	101
Anexo 2 – Análise de Resíduos	103
Anexo 3 – Teste de RIKILT	104
Anexo 4 – Teste de Mandel ou Teste de Snedecor/Fisher	105

Índice de Figuras

Figura 2.1.	Esquema de corte transversal e longitudinal de um fruto citrino mostrando: (a) flavedo, (b) sementes, (c) vesículas de sumo, (d) eixo central, (e) albedo, (f) segmento, (g) membrana do segmento	5
Figura 2.2.	Representação estrutural da (a) limonina, (b) ácido limonóico, (c) ácido deoxilimonóico e (d) isómero do ácido limonóico, à esquerda. À direita, estruturas da limonina, naringina e glucósido da limonina	9
Figura 2.3.	Via biossintética dos limonóides em citrinos e mecanismo do aparecimento do sabor amargo	10
Figura 2.4.	Fluxograma demonstrativo do processamento para uma utilização primária de frutos citrinos	20
Figura 2.5.	Estruturas químicas da β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina	28
Figura 3.1.	Microplaca de 24 poços.	48
Figura 3.2.	Cromatograma característico das análises quantitativas da limonina (pico identificado no tempo de retenção 8,255)	50
Figura 3.3.	Curva de calibração da glucose pelo método DNS	52
Figura 3.4.	Medição do volume da pata do rato no pletismómetro	63
Figura 4.1.	Testes estatísticos para estudo da linearidade. Curva de Calibração (a.), análise de resíduos (b.), teste das áreas normalizadas (c.) e teste RIKILT (d.)	67
Figura 4.2.	Representação gráfica da concentração de limonina vs. tempo de contacto para cada uma das resinas utilizadas	74
Figura 4.3.	Eficiência da adsorção da limonina em função do $t_{1/2}$, a	76

30°C, nas resinas: XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18

- Figura 4.4.** Eficiência de adsorção de limonina em função da 77
concentração de adsorvente, após 60 min (♦XAD-18; O
XAD-1600N)
- Figura 4.5.** Isotérmicas de adsorção (modelos de Freundlich e 79
Langmuir) de limonina para as 3 resinas: XAD-18, XAD-16N
e XAD-1600N
- Figura 4.6.** Isotérmicas de adsorção de açúcares redutores (modelos 80
de Freundlich e Langmuir) de limonina para as 3 resinas:
XAD-18, XAD-16N e XAD-1600N
- Figura 4.7.** Estudo da complexação da limonina nas ciclodextrinas 84
gama e beta em sumos de laranja.
- Figura 4.8.** Aumento do volume do edema da pata do rato às 6 horas, 86
após administração de sumo processado com resina XAD-
18 e com sumo não processado.
- Figura 4.9.** Aumento do volume do edema da pata do rato às 6 horas, 88
após administração de sumo processado com β -
ciclodextrina e com sumo não processado.

Índice de Tabelas

Tabela 2.1.	Composição dos frutos citrinos (quantidades por 100 g)	8
Tabela 3.1.	Propriedades das resinas poliméricas	46
Tabela 3.2.	Propriedades das Ciclodextrinas	46
Tabela 3.3.	Reagentes utilizados na análise por HPLC e nos outros métodos analíticos	47
Tabela 3.4.	Esquema de diluições de amostras	58
Tabela 3.5.	Grupos de animais para ensaios com sumo processado com resina XAD-18	62
Tabela 3.6.	Grupos de animais para ensaios com sumo processado com β -ciclodextrina	62
Tabela 4.1.	Parâmetros da curva de calibração da limonina por HPLC-UV e respectivos limiares analíticos	65
Tabela 4.2.	Ensaio de precisão do método de HPLC-UV para a determinação da limonina	68
Tabela 4.3.	Ensaio de recuperação da limonina em sumo de laranja (n=3)	69
Tabela 4.4.	Análise de limonina em sumos de citrinos	70
Tabela 4.5.	Pâmetros estimados para o modelo da adsorção da limonina em função do tempo	75
Tabela 4.6.	Pâmetros estimados para os modelos das isotérmicas de Freundlich e Langmuir	81
Tabela 4.7.	Factor de afinidade (q_e/C_e), área de superfície de adsorvente disponível para adsorção (q') e factor de separação, a 30°C.	83

Símbolos e abreviaturas

a	Ordenada na origem (equação da recta $y = a + bx$)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
b	Declive da recta (equação da recta $y = a + bx$)
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DVB	Divinilbenzeno
EIA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
F	Valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher
FDA	Food and Drug Administration
FMC	Food Machinery Corporation
FMC-TASTE	Food Machinery Corporation - Thermally accelerated short time evaporator
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HP	Hewlett-Packard
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
ISO	International Standard Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LARL	Limonina monolactona
LC	Cromatografia líquida
ESI	Ionização por electrospray
MS	Espectrometria de massa
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação

MNR	Ressonância magnética nuclear
RIA	Radioimunoensaios
TLC	Cromatografia de camada fina
VT	Valor de teste para estudo das funções lineares
x	Variável independente (equação da recta $y = a + bx$)
y	Variável dependente (equação da recta $y = a + bx$)

1. Introdução e Objectivos

O desenvolvimento de sabor amargo após o processamento dos sumos de laranja é um problema comum e o principal dissuador na utilização de certas variedades de laranjas, tais como, a laranja Navel, a laranja Natsudai e a toranja para a produção de sumos. Esse sabor amargo advém, principalmente de um triterpenóide tetracíclico denominado de limonina e de um flavonóide naringina.

A limonina é amarga e encontra-se em maiores concentrações em porções não comestíveis dos citrinos (por exemplo, casca e sementes), possuindo uma capacidade de solubilidade em água limitada.

Foram desenvolvidos diferentes métodos analíticos como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase normal, HPLC de fase reversa, ressonância magnética nuclear (NMR) e cromatografia líquida/ionização por electrospray/espectrometria de massa (LC/ESI/MS) para isolar, quantificar e caracterizar antocianidinas e glucósidos limonóides em pequenas quantidades.

O sabor amargo sentido no sumo de alguns citrinos, tem levado à publicação de diversos estudos com métodos para o seu controlo. Métodos esses que são maioritariamente efectuados por adição ao sumo de agentes supressores do sabor amargo, com recursos a adsorventes, a enzimas extraídas de culturas bacterianas e à utilização de bioreguladores para acelerar o metabolismo dos limonóides no fruto antes e após a colheita e antes do processamento.

Os resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a bioactividade destes compostos sugerem que os limonóides dos citrinos possuem actividade anti-tumoral, anti-HIV e potenciais propriedades de baixar os níveis de colesterol. São ainda referidos os seus efeitos anti-malária e actividade anti-inflamatória, actuando também como agentes citotóxicos e citostáticos em culturas de células animais e humanas. Os efeitos antiproliferativos dos limonóides foram demonstrados em diversas formas de cancro.

A maioria dos estudos acerca de limonóides foi realizada ou com

misturas ou por aplicação tópica em animais devido à falta de grandes quantidades de compostos no estado puro.

Este estudo centrou-se na (i) análise, (ii) supressão da limonina dos citrinos (laranjas), com a finalidade de melhorar as características organolépticas dos sumos e (iii) e avaliação da bioactividade deste composto. Para esse efeito, efectuou-se a optimização e validação do método de identificação e doseamento por HPLC-UV da limonina presente no sumo de laranja. Testou-se também a utilização de adsorventes (resinas neutras AmberliteTM XAD-18, XAD-16N e XAD-1600N) e de ciclodextrinas (β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina), para a supressão da limonina.

Efectuou-se ainda a determinação da exposição sistémica das substâncias que compõem o sumo, nomeadamente a limonina, num modelo experimental *in vivo*, com estudos comparativos dos sumos de laranja antes e após o processamento com as resinas neutras e com a β -ciclodextrina.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Os citrinos: Frutos e Sumos

O género *Citrus*, apresenta-se como o maior dentro da sub-família *Aurantioideae*, onde por todo o mundo crescem árvores deste género. A frequência de mutações espontâneas, assim como, a grande ocorrência de híbridos naturais em conjunto com um número elevado de híbridos inter-específicos, obtidos artificialmente originou a existência de um grande número de variedades, com maior ou menor interesse comercial, recebendo nomes locais e complicando a identificação taxonómica de cada uma delas. Os citrinos são populares e possuem valor nutricional e medicinal comprovado.

Dois sub-géneros existem nos citrinos: o sub-género *Papeda* e o sub-género *Eucitrus* (*Citrus*). De acordo com Swingle (1967) [2] este sub-género tem dez espécies que são: *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. limon*, *C. medica*, *C. aurantifolia*, *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. indica* and *C. tachibana*.

Destas espécies destacam-se duas: a *C. sinensis* e a *C. aurantium*, as laranjas doces e as laranjas amargas, respectivamente.

As **laranjas doces** pertencem à espécie *Citrus sinensis* (L.) Osb., sendo a maioria das árvores citrinas existentes nos países produtores desta espécie. Existem quatro grupos dentro desta espécie:

Laranjas Navel: distinguem-se pelo desenvolvimento de uma segunda laranja na base do fruto, pequena e atrofiada, o que lhe confere o aspecto de um “umbigo”, e incluem as variedades 'Washington', 'Thompson', 'Navelina', 'Navelate' e 'Newhall';

Laranjas comuns: também designadas por laranjas brancas. Incluem as variedades mais antigas que crescem em diferentes países, possuem nomes locais e são difíceis de distinguir. Algumas das mais conhecidas são: 'Jaffa' de Israel, 'Biondo comune' de Itália, 'Pera' do Brasil ou 'Pineapple' e 'Valencia' dos EUA.

Laranjas vermelhas: caracterizam-se pela presença de antocianina no

fruto, conferindo ao seu sumo, polpa ou casca uma cor vermelha, mais ou menos intensa. As variedades desta grupo são 'Moro', 'Tarocco', 'Sanguinelli' e 'Doble fina'.

“Laranjas doces com baixa acidez”: são laranjas doces com baixa acidez no seu sumo. As variedades existentes são a “Sucreña” ou “Imperial” e a “Succari”.

As **laranjas amargas** pertencem à espécie *C. Aurantium* L.. Possuem normalmente mais sementes e a casca do fruto apresenta uma cor laranja mais intensa que a generalidade das variedades de laranjas doces. Entre as laranjas amargas/azedas existem os seguintes grupos: “Seville”, “Bouquet de Fleurs”, “Granito” ou “Abers”, “Chinotto” e “Bergamot”.

A Introdução da laranja na Europa

É conhecido dos diários de Vasco da Gama, de Gaspar Corrêa e do italiano Andrea Corsali que os Portugueses tiveram conhecimento da laranja comum em África, na Índia e na China. A “*laranja da China*”, como era designada a laranja doce, rapidamente ficou conhecida como a “*laranja Portuguesa*”, termo utilizado nos países mediterrâneos até ao início do século XX. Valmont de Bomare foi o primeiro escritor a mencionar que a “*laranja da China*”, foi criada em Lisboa em 1520. A cultura da laranja rapidamente se propagou por Portugal. Em 1550 iniciou-se um processo de exportação para Espanha e em 1610 para outros países da Europa. Os locais de produção eram essencialmente ao longo do rio Tejo, em Sintra, Colares e na Ribeira de Barcarena [3].

2.1.1. Frutos

Os citrinos são “bagas” modificadas conhecidas como hesperídio (*hesperidia*). As características deste tipo de fruto são a sua forma mais ou

menos esférica embora, dependendo da espécie, pode ser achatado como as tangerinas ou elipsóide como os limões e as limas. A parte externa da casca é denominada de flavedo (epicarpo) devido a presença de compostos flavonóides, sendo a espessura variável, a pigmentação que varia com a espécie ou a variedade, apresentando cores que vão desde a cor laranja escuro ou avermelhada à cor laranja claro, amarelo ou esverdeado.

Quando visualizada a secção longitudinal do citrino, da parte mais externa para a parte mais interna, ele apresenta as seguintes camadas (Fig. 2.1):

- uma película fina que pertence às células da epiderme e que contém os estomas;
- o epicarpo ou flavedo, composto por tecido parenquimatoso rico em pigmentos (cloroplastos ou cromoplastos);
- o albedo, tecido parenquimatoso com células com forma irregular e esponjosas, que apresentam uma cor branca e estão separadas por bolsas de ar;
- o endocarpo, que é a parte comestível do fruto, composta por segmentos que possuem vesículas com paredes muito finas onde se encontra o sumo. Os segmentos estão cobertos por uma membrana carpelar e estão distribuídos à volta do eixo central que possui a mesma composição do albedo;
- as sementes, encontram-se à volta do eixo central e incluídas no endocarpo.

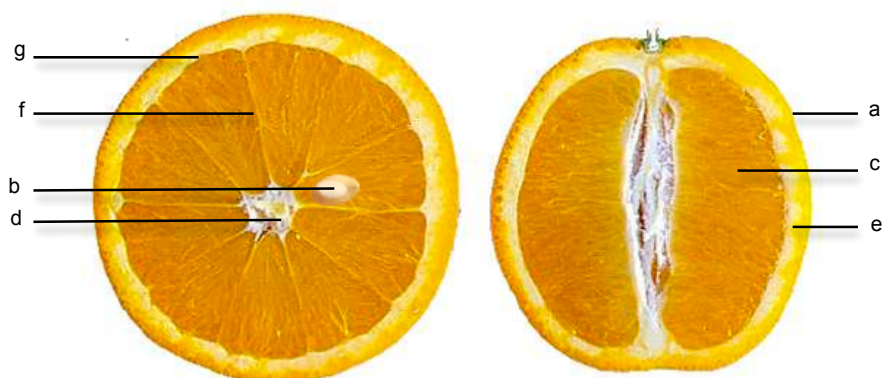


Figura 2.1. Esquema de corte transversal e longitudinal de um fruto citrino mostrando: (a) flavedo, (b) sementes, (c) vesículas de sumo, (d) eixo central, (e) albedo, (f) segmento, (g) membrana do segmento

No flavedo existem numerosas glândulas com óleos essenciais, com formas esféricas e de diferentes tamanhos, que podem ser salientes como no pomelo (*C. maxima*) e na laranja doce (*C. Sinensis*) ou na toranja (*C. paradisi*), ou com cavidades como na laranja azeda/amarga ou nas tangerinas.

A parte interna da casca, o albedo (mesocarpo), tem uma parte esbranquiçada ou amarela claro e a sua textura é esponjosa. A espessura e a consistência do albedo varia com a espécie. A tangerinas, por exemplo, possuem um mesocarpo fino, enquanto que as toranjas têm uma camada ligeiramente mais grossa, possuindo os limões uma camada bastante grossa. Tanto o flavedo (epicarpo) como o albedo (mesocarpo) da casca, são normalmente a parte não comestível do fruto.

A parte comestível do fruto é composto pelo endocarpo (gomos), com vacúolos com uma película muito fina, denominada membrana carpelar. Uma imagem da secção transversal de um citrino demonstra a forma de cada “gomo”, sendo que um citrino apresenta normalmente 8 a 12 “gomos”. Cada “gomo” está coberto por uma membrana, ligeiramente grosseira e coberta por feixes vasculares que transferem nutrientes para o crescimento do fruto. Dentro das membranas encontra-se um grande número de vesículas, que contêm o sumo dentro de vacúolos. A parte central do fruto é denominada de eixo central ou medula central, que possui uma textura e consistência muito semelhante ao albedo (mesocarpo).

Em alguns casos, ocorre uma modificação no fruto, com a formação de um pequeno fruto secundário desenvolvido no ápice do conjunto dos gomos, que é chamado de “umbigo”, daí as laranjas Navel (umbigo). Quando este pequeno fruto está presente, pode ser observado do exterior assim como em detalhe quando o fruto se encontra descascado.

Os frutos maduros possuem o cálice na sua base enquanto no topo se encontra uma pequena cicatriz, onde estava preso o pedúnculo. A forma dos frutos varia consoante a espécie, podendo ser esférica, elipsóide, oblíqua [3].

2.1.2. Composição

A composição química dos frutos citrinos é condicionada pelas condições de crescimento, pelos tratamentos sofridos, maturação, variedade do fruto e clima. Contudo, podem considerar-se os constituintes abaixo descritos e sumarizados na tabela 2.1 como os mais importantes.

No que diz respeito aos hidratos de carbono, os açúcares mais importantes são a glucose, frutose e sacarose, responsáveis pelo sabor doce do sumo de citrinos, situando-se o teor médio de açúcares totais em vários frutos entre os 5 % e 10 % [4]. A proporção de glucose e frutose nos sumos de citrinos é de 1:1, sendo a sacarose o único oligossacárido [3, 4].

O teor total de lípidos no sumo varia entre os 84 e 101 mg/100 mL, sendo os principais ácidos gordos, o ácido palmítico, o ácido palmitoleico, o ácido oleico, o ácido linoleico e ácido linolénico [5].

Os carotenóides são os principais pigmentos presentes nos citrinos, apresentando um complexo padrão de distribuição, mas em que os mais importantes são: β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, mutatoxantina, luteoxantina, auroxantina e trolixantina [6]. A constituição em minerais é bastante variada e melhor conhecida para os sumos, estando presentes em maior concentração o cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio, em concentração igual ou superior a 10 mg/L. Já o ferro, zinco, cobre e manganésio também estão presentes, mas em menor concentração [7]. A vitamina C predomina no fruto e no sumo, mas estão também presentes outras vitaminas como a tiamina, a riboflavina, niacina, piridoxina e a provitamina A [7].

Os ácidos orgânicos são outros dos constituintes de relevo, sendo de destacar entre estes o ácido cítrico, responsável por 95 % da acidez total [7], mas podem também ser encontrados o ácido málico e quínico. Estes compostos conferem ao sumo de laranja um baixo pH, que varia geralmente entre 3 e 4, e um elevado poder tampão [8].

Os flavonóides e limonóides são compostos químicos de elevada relevância, podendo inclusive o seu padrão de distribuição ser utilizado para fins taxonómicos, mas de onde será dada mais atenção à limonina, objecto de observação mais detalhada nas secções seguintes.

Tabela 2.1. Composição dos frutos citrinos (quantidades por 100 g) adaptado de [3]

		Humidade (%)	Calorias (cal)	Proteínas	Lípidos	Hidratos de carbono		cinzas	Elementos minerais (mg)					Vitaminas				
						total	celulose		Ca	P	Fe	Na	K	Vit. A (UI)	Tiamina B1 (mg)	Riboflavina B2 (mg)	Niacina (mg)	Ac. ascórbico (mg)
Limas	Fruto fresco	89,3	28	0,7	0,2	9,5	0,5	0,3	33	18	0,6	2	102	10	0,03	0,02	0,2	37
	Sumo	90,3	26	0,3	0,1	9	vestígios	0,3	9	11	0,2	1	104	10	0,02	0,01	0,1	32
Tangerinas	Fruto fresco	87	46	0,8	0,2	11,6	0,5	0,4	40	18	0,4	2	126	420	0,06	0,02	0,1	31
	Sumo	88,9	43	0,5	0,2	10,1	0,1	0,3	18	14	0,2	1	178	420	0,06	0,02	0,1	31
Laranjas doces	Fruto fresco	82,3	40	1,3	0,3	15,5	-	0,6	70	22	0,8	2	196	250	0,1	0,05	0,5	71
	Endocarpo	86	49	1	0,2	12,2	0,5	0,6	41	20	0,4	1	200	200	0,1	0,04	0,4	50
	Casca	72,5	-	1,5	0,2	25	-	0,8	161	21	0,8	3	212	420	0,12	0,09	0,9	136
	Sumo	88,3	45	0,7	0,2	10,4	0,1	0,4	11	17	0,2	1	200	200	0,09	0,03	0,4	50
Toranjas	Endocarpo	88,4	41	0,5	0,1	10,6	0,2	0,4	16	16	0,4	1	135	80	0,04	0,02	0,2	38
	Sumo	90	39	0,5	0,1	9,2	vestígios	0,2	9	15	0,2	1	162	80	0,04	0,02	0,2	38
Limões	Fruto fresco	87,4	20	1,2	0,3	10,7	-	0,4	61	15	0,7	3	145	30	0,05	0,04	0,2	77
	Endocarpo	90,1	27	1,1	0,3	8,2	0,4	0,3	26	16	0,6	2	138	20	0,04	0,02	0,1	53
	Casca	81,6	-	1,5	0,3	16	-	0,6	134	12	0,8	6	160	50	0,06	0,08	0,4	129
	Sumo	91	25	0,5	0,2	8	vestígios	0,3	7	10	0,2	1	141	20	0,03	0,01	0,1	46

IU – unidades internacionais

2.1.3. Limonina

Os limonóides, descritos pela 1ª vez em 1864 [9], são triterpenos modificados altamente oxigenados que derivam de um precursor com um esqueleto de 4,4,8-trimetil-17-furanilesteróide sintetizado via acetato-mevalonato nos citrinos [10, 11] e observados nas famílias de *Rutaceae*, *Meliaceae* e outras famílias de plantas relacionadas [12], onde se incluem frutos regularmente consumidos pelos humanos, tais como as laranjas, as toranjas, as tangerinas, os limões e as limas [13].

Todas as ocorrências naturais de limonóides em citrinos contêm um anel furano ligado ao anel D no C-17 (carbono-17) (Fig. 2.2).

A limonina e a nomilina são os limonóides mais prevalentes nos citrinos. A via biossintética da limonina encontra-se na figura 2.3.

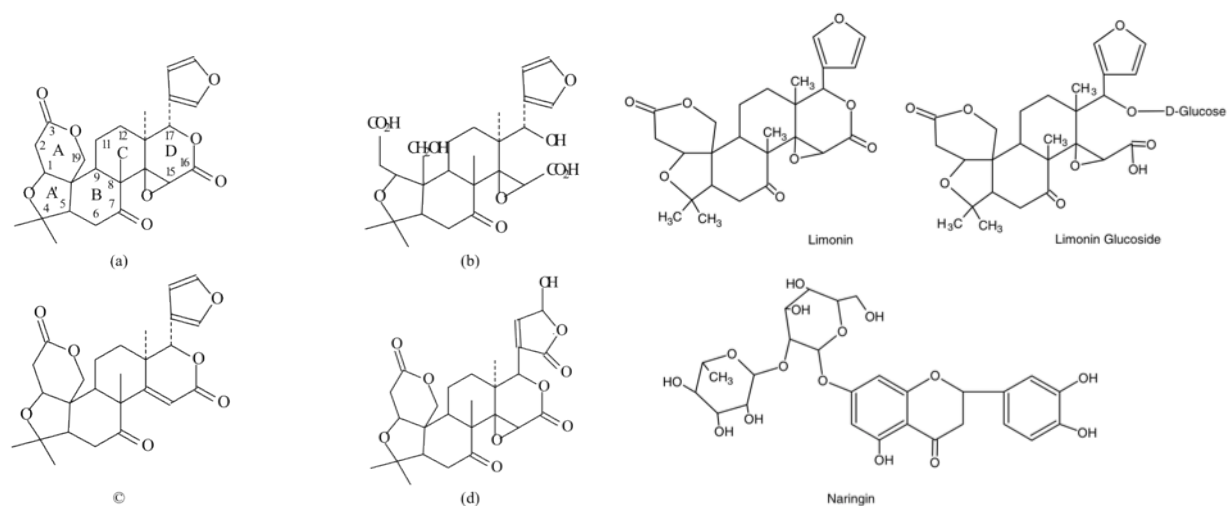


Figura 2.2. Representação estrutural da (a) limonina, (b) ácido limonóico, (c) ácido deoxilimonoico e (d) isómero do ácido limonéxico, à esquerda. À direita, estruturas da limonina, naringina e glucósido da limonina. Adaptado de [14, 15].

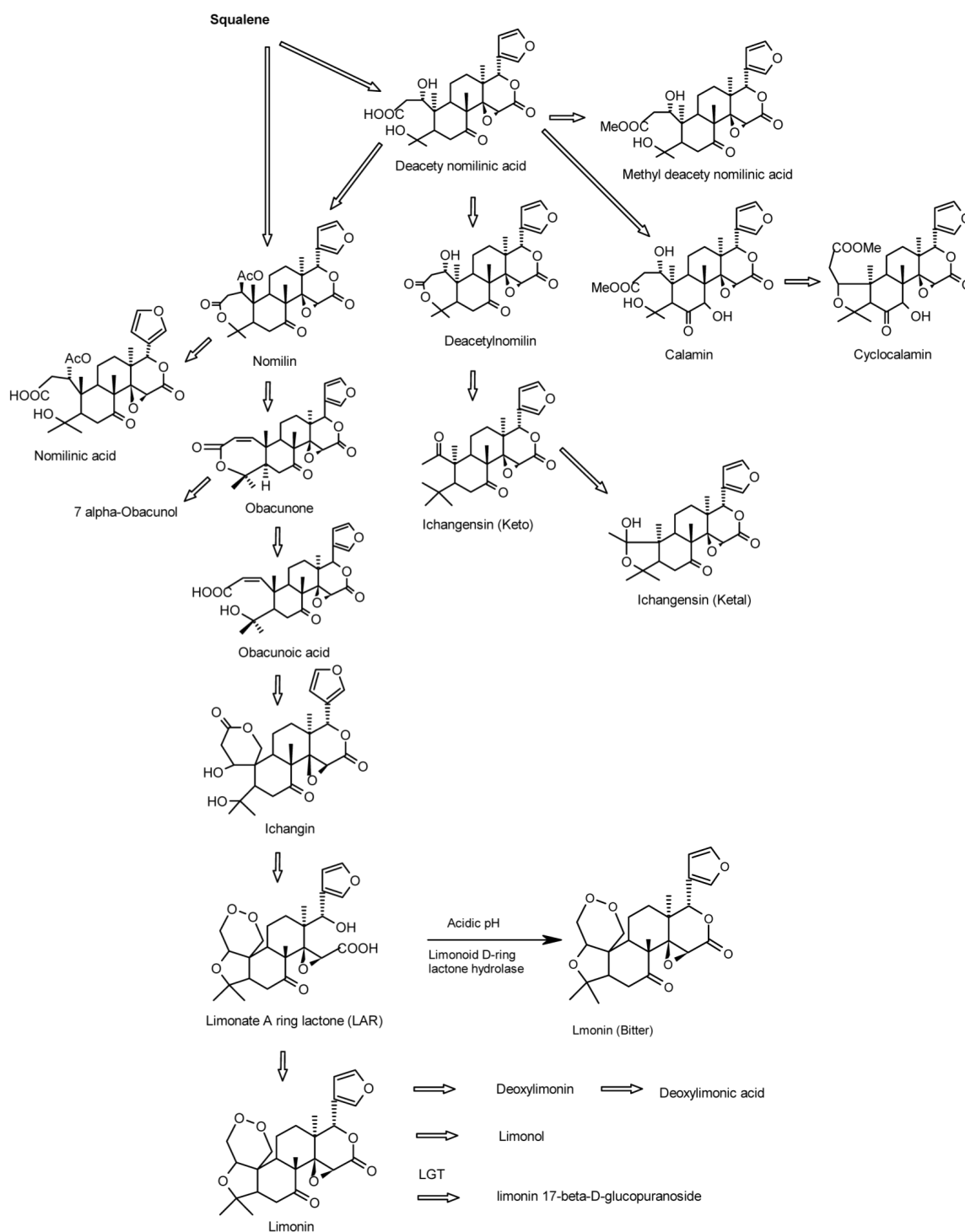


Figura 2.3. Via biossintética dos limonóides em citrinos e mecanismo do aparecimento do sabor amargo. Adaptado de [16].

Os limonóides ocorrem em quantidades significativas como agliconas e glucósidos em sementes e fruto de espécies citrinas [10] e são sintetizados nos citrinos durante a maturação do fruto [17]. Aproximadamente 37

agliconas de limonóides e 19 glucósidos de limonóides foram identificados nos citrinos e seus híbridos.

As agliconas de limonóides, como a limonina, a nomilina e a obacunona, são compostos amargos com baixa solubilidade em água e encontrados principalmente nas sementes dos frutos [17, 18]. A limonina é um composto quimicamente relacionado aos derivados triterpenos encontrados nas famílias *Rutaceae* e *Meliaceae*. Em comparação com as agliconas os glucósidos de limonóides são compostos sem sabor e solúveis em água, que se formam durante a maturação e processamento das suas agliconas correspondentes. Em cada caso, a molécula de glucose está ligada no anel D do C-17 do núcleo limonóide por uma ligação α -glicosídica. Comparando com as agliconas, que se encontram em baixas concentrações nos frutos, a concentração de glucósidos limonóides em conjunto é extremamente elevada. A média de concentração do conjunto dos glucósidos limonóides no sumo de laranja, sumo de toranja e sumo de limão é 320, 200 e 100 ppm, respectivamente [11, 19].

A limonina foi descoberta como o composto amargo do sumo de laranjas Navel por volta de 1949. Enquanto certos limonóides são estudados devido ao sabor amargo, outros são investigados intensivamente devido à sua actividade biológica variada [10, 17].

O sabor amargo dos limonóides ocorre gradualmente depois do processamento dos sumos de citrinos, sendo referido como um sabor amargo posterior e também depois dos citrinos terem sido congelados e de sofrerem danos mecânicos. A limonina é, dos limonóides, o composto responsável pela maioria do sabor amargo que tende a aparecer nos sumos com o passar do tempo. Muitos desenvolvimentos bioquímicos foram aplicados para eliminar o sabor amargo que aparece ao longo do tempo e a que os sumos sejam de qualidade aceitável para os consumidores. Normalmente, os frutos com tecidos intactos contêm o precursor não amargo da limonina, a lactona anel-A do ácido limonóico (limonina monolactona - LARL). A conversão do LARL a limonina ocorre sob condições ácidas, a um pH abaixo de 6.5 e é aumentada pela acção da enzima limonina anel-D-lactona hidrolase.

O padrão de acumulação de glucósidos de limonóides é diferente

entre espécies de citrinos, mas a variedade dos limonóides é a mesma. O teor de limonóides em frutos citrinos diminui durante o processo de amadurecimento. Este decréscimo considera-se ser devido à conversão do limonóide no seu glucósido correspondente [12].

Inicialmente os limonóides de citrinos eram o maior problema da indústria de sumos de citrinos, devido a, com o passar do tempo e à temperatura ambiente, causarem sabor amargo aos sumos, o que leva a que o seu valor comercial e a sua qualidade diminuam.

Contudo, recentemente, estes compostos têm vindo a ganhar grande importância na inibição de diversas doenças crónicas [20].

2.1.4. Bioactividade

Os frutos e vegetais são uma fonte de vitamina C e antioxidantes fenólicos, que estão associados ao baixo risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, cancro, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas [21].

Os frutos citrinos são uma fonte rica em fibras e compostos bioactivos, incluindo a vitamina C, fenólicos e flavonóides, com potenciais propriedades na promoção da saúde. Estes compostos bioactivos são conhecidos por actuarem como captadores de radicais livres, moduladores da actividade enzimática e por protegerem de algumas doenças, particularmente, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro [19]. O estudo da estabilidade da limonina é útil para avaliar a sua actividade e biodisponibilidade, assim como para a determinação do seu “tempo de prateleira” [14].

Os citrinos são importantes devido às suas propriedades nutricionais e antioxidantes. Para além do ácido ascórbico, este género contém glicósidos de flavonas, tais como hesperidina, narirutina e naringina, o mais importante fenol na fracção solúvel em água. Outros compostos, como limonóides (derivados dos triterpenos), algumas flavonas – sinensetina e nobilitina, e fenilpropanóides – hidroxicinamatos, possuem elevados potenciais antioxidantes e de promoção da saúde. É importante demonstrar o efeito do processamento mínimo destes compostos e a sua capacidade antioxidante,

que se sabe ser influenciável pelo processamento e armazenamento [21].

Em adição à propriedade de conferir sabor amargo, os limonóides possuem importantes funções biológicas. Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* que examinaram a bioactividade destes compostos sugerem que os limonóides dos citrinos possuem actividades anti-tumorais e anti-HIV assim como potenciam a redução do colesterol. A limonina e o glucósido da limonina são os limonóides mais abundantes na maioria das espécies citrinas. A solubilidade da limonina em água é limitada (< 40 mg/L), é amarga e encontra-se em concentrações superiores nas porções não-edíveis do fruto citrino, como o mesocarpo e as sementes. A concentração de limonina no sumo é normalmente inferior a 20 mg/L, contudo, concentrações de 5 mg/L levam a que o sumo seja rejeitado pelos consumidores devido ao sabor amargo excessivo. Pelo contrário, o glucósido de limonina é solúvel em água, sem sabor e encontra-se no sumo de laranja em concentrações de cerca de 720 mg/L [22].

Os limonóides inibem quimicamente a carcinogénese em ratinhos, hamsters e em culturas de células humanas do cancro da mama. Possuem ainda capacidade de actuar como insecticida natural contra alguns insectos e invasores [12], actuando como pesticida natural. É ainda demonstrado por alguns estudos que dietas com suplementos de limonóides de citrinos, limonina e nomilina, activam a glutathione-S-transferase no fígado e no pequeno intestino de ratos e suprime a carcinogénese. *In vitro*, a limonina, a nomilina e os glucósidos limonóides provaram ter capacidade para inibir a proliferação do cancro da mama. Sendo a nomilina a mais eficaz, seguida da limonina e dos glucósidos limonóides [9].

A limonina foi estudada como agente abortivo, substância amoebicida, agente quimiopreventivo e inibidor da carcinogénese da cavidade oral. Como consequência a limonina demonstra ser valiosa na promoção da saúde [14].

Recentemente, devido às qualidades funcionais dos limonóides, que são abundante em citrinos, e a todos os estudos que têm sido realizados, verifica-se um aumento comercial significativo nos frutos citrinos. A maneira mais fácil de ingestão dos limonóides é bebendo sumo e comendo o próprio fruto, no entanto substâncias que conferem sabor amargo, como a limonina, a nomilina e a obacunona, diminuem a sua utilização.

Por outro lado, glucósidos limonóides de citrinos não-amargos, que não possuem sabor e solúveis em água, demonstraram igualmente possuir actividade anti-cancerígena na carcinogénese oral em hamsters, assim como em culturas de células humanas do cancro da mama. A actividade biológica dos glucósidos limonóides não amargos é igual ao valor dos limonóides amargos, sendo a solubilidade em água um factor importante na aplicação médica. Para além de mais, uma vez que uma grande quantidade de glucósidos limonóides (100 ppm) existem em muitos tipos de sumos de citrinos e em muitos frutos citrinos frescos, é fácil inseri-los na dieta alimentar como anti-cancerígenos. Uma vez que os humanos consomem frutos citrinos como alimentos desde os tempos antigos, pode-se afirmar que os limonóides citrinos são compostos bastante seguros para a saúde humana. Por conseguinte, não só para a indústria de processamento de citrinos mas também para os consumidores, os glucosidos limonóides são compostos bastante importantes. [12]. Os resíduos dos citrinos têm também sido descritos como sendo boa fonte de pectinas e fibras dietéticas. Verifica-se ainda que os resíduos contêm mais anti-oxidantes naturais que o sumo ou o fruto fresco. Uma vez que os compostos bioactivos são sensíveis a tratamento térmico, a operação de processamento tem de ser optimizada para melhorar a sua retenção no produto final [19]. A biodisponibilidade demonstrada e a abundância na dieta do glucósido de limonina, em conjugação com capacidade de formular alimentos e bebidas funcionais levaram a que Breksa e Dragull [22], isolassem este composto para efectuarem uma avaliação das propriedades físicas e das actividades biológicas. As quantidades necessárias de composto foram obtidas a partir de desperdícios do processamento de sumos de citrinos. O material isolado foi posteriormente adicionado às bebidas para estudos de estabilidade, contudo, verificou-se que o isolamento do composto não tinha tido sucesso, porque os resultados dos testes de sabor efectuados às bebidas demonstraram que estas eram demasiado amargas para poderem ser consumidas [22].

Estudos epidemiológicos demonstraram fortes evidências de que dietas contendo frutos e vegetais diminuem os potenciais riscos de cancro

em humanos. Um grande número de estudos efectuados em animais de laboratório demonstraram igualmente que uma grande quantidade de compostos bioactivos não-nutritivos da dieta derivam de frutos e vegetais e inibem a carcinogénese química causada pelos electrófilos e espécies reactivas de oxigénio que advêm de fontes endógenas e exógenas. Um dos possíveis mecanismos responsáveis pelo papel protector do consumo de frutas e vegetais é a indução da fase II xenobiótica de enzimas metabolizantes, onde se incluem a glutathione-S-transferase, a quinona redutase e a UDP-glucuronosiltransferase [20].

2.2. Sumos de citrinos

O sumo de citrinos é a apresentação mais popular dos produtos citrinos. Contudo, o sumo de citrinos é apenas 50% do total do fruto utilizado, a restante parte é normalmente rejeitada após a extracção do sumo. Para adicionar valor ao resíduo dos citrinos, estes têm sido processados em diversos produtos, tais como, alimentação animal, pectinas e óleos essenciais [19].

Ao longo dos últimos 20 anos verificou-se um interesse crescente, por parte dos consumidores, em produtos hortícolas e frutícolas que tenham sido pouco processados devido a sua frescura. Para além disso, o consumo de frutas e vegetais estão largamente descritos na literatura [21].

Os sumos das diversas variedades de citrinos deparam-se com problemas comerciais devido ao seu sabor amargo, causado pelos limonóides. A quantidade de limonóides nos frutos citrinos diminui durante o processo de maturação. Esta diminuição deve-se à conversão dos limonóides nos seus glucósidos correspondentes. Nos sumos de citrinos, os níveis de glucósidos são muito superiores aos níveis de limonóides livres. Os limonóides livres são os responsáveis pelo sabor amargo existente depois da preparação dos sumos [23].

Operações como descascar e cortar estes produtos reduzem o seu tempo útil de vida, uma vez que diversos processos metabólicos são

acelerados. Danos mecânicos aumentam a actividade respiratória e a produção de etileno, aumentando alguns efeitos bioquímicos como consequência, tais como descoloração enzimática e perda de aroma, firmeza e qualidades nutricionais. Temperaturas baixas durante o processamento e armazenamento, diminui consideravelmente a actividade bioquímica e a proliferação microbiana. Danos na superfície do fruto criam condições óptimas para a decomposição dos componentes do sumo e a um rápido aumento dos microrganismos. Para manter a boa qualidade, o produto deve ir processado e armazenado a temperatura não superiores a 5° C. Em países do Norte da Europa, produtos vegetais embalados são amplamente comercializados enquanto os frutos preparados tem uma distribuição mais restrita, pois apresentam mais problema do que os vegetais devido à sua composição química e fisiológica [21].

2.2.1. Indústria – Sumos

Durante muito tempo o processo industrial dos citrinos baseou-se, apenas na extracção de óleos essenciais existentes na casca.

Em particular, no que diz respeito à produção de sumo, os resultados da pesquisa realizadas pelas indústrias da Califórnia e da Florida desde o início do século XX podem ser consideradas decisivas. O avanço da tecnologia, permitindo a conservação dos sumos durante mais tempo (especialmente a pasteurização-flash e a concentração em vácuo), foi um factor importante para o desenvolvimento da produção de sumos. O crescimento desta produção foi também possível pela utilização simultânea dos resíduos húmidos ou secos na alimentação do gado bovino.

Pode-se afirmar que apenas nas décadas recentes se assistiu a um crescente aumento da indústria de sumos, devido também à percepção que os consumidores têm vindo a ganhar das propriedades nutricionais básicas e da riqueza em vitaminas dos sumos de fruta e não simplesmente como ingredientes das bebidas. Há uma tendência, no interesse dos consumidores, para se afastarem dos produtos fermentados conhecidos desde a antiguidade (como o vinho e a sidra) e se aproximarem de produtos naturais, como parte

de uma dieta racional mais planeada. Naturalmente, esta mudança nos gostos dos consumidores não foi apenas determinada pelo aumento da percepção das propriedades nutricionais dos sumos de frutos. O factor principal foi o aumento da capacidade da indústria para preparar produtos de alta qualidade que satisfazem tanto as características organolépticas como as que derivam do fruto original. Tudo isto, em conjunto, com a vantagem dos produtos de que os frutos chegam ao consumidor mesmo fora da sua época.

Durante muito tempo a extracção de sumos foi efectuada manualmente, em espremedores e uma metade do fruto de cada vez. A maior dificuldade em mecanizar esta operação é que cada metade do fruto tem que ser tratada separadamente. Contudo, desde os anos 30 do século passado, muitas tentativas foram feitas para tentar imitar o método manual, substituindo-o com um procedimento mecânico.

A primeira tentativa foi feita, patenteando uma máquina que cortava o fruto com uma lâmina circular, e o sumo era extraído sem causar estragos na casca. Devido às dificuldades técnicas que existiam na altura na Palestina, a patente nunca teve utilização comercial, mas o seu princípio inspirador levou à construção uma máquina que foi utilizada com sucesso na Califórnia, com melhoramentos para o seu progresso.

No mesmo período, outra patente foi conseguida, baseando-se num sistema em que cada fruto era tratado individualmente, cortado em duas metades que eram depois empurradas contra dois espremedores.

Todos os outros extractores são baseados em princípios completamente diferentes. A maioria deles, apesar de serem extremamente engenhosos, possui o defeito de exercer uma pressão alta na casca, causando a extracção de uma quantidade considerável de óleos essenciais, assim como líquidos provenientes do albedo. Entre estas máquinas é necessário referir as construídas pela *Food Machinery Corporation* (FMC), com o nome de Skinner e Polk (1937), pela *Rotary Juice Press* (Fauld) e pela Bireley's Inc. of Los Angeles (Citromat).

Há ainda referências a inúmeras outras máquinas desenhadas nos EUA para a extracção mecânica do sumo, apesar de quase nenhuma ter sido produzida comercialmente [24].

2.2.2. Processamento

O processamento industrial dos citrinos pode resultar na deterioração da limonina e de outros compostos citrinos. O grau de deterioração depende de uma variedade de factores, que incluem a temperatura, o pH, a exposição à luz e ao ar. Todos estes factores podem afectar a actividade e a estabilidade da limonina. O estudo da estabilidade da limonina é útil para avaliar a sua actividade e biodisponibilidade, assim como para a determinação do seu “tempo de prateleira” [14, 25].

A figura 2.4 demonstra o fluxograma da extracção dos óleos essenciais e do sumo simultaneamente.

Por sua vez, todos os procedimentos para a extracção dos óleos essenciais de todo o fruto pode ser classificado da seguinte forma: de acordo com a maneira como o fruto é tratado - raspagem superficial, geralmente uma operação pouco drástica e a que causa menos estragos nos tecidos do fruto; abrasão total ou extracção da casca exterior que contém os óleos essenciais.

Além disso, no que diz respeito às máquinas que operam sobre a casca do fruto após a extracção do sumo, o processo mais comum de 'slow-folding' ou *sfumatura*, empregando o mecanismo que reproduz largamente o processo manual. A extracção pode também existir de uma forma mais drástica, por meio de prensas que trabalham continuamente.

A extracção dos sumos pode também ser efectuada com metades de frutos utilizando máquinas baseadas em diversos princípios. Nalgumas, a extracção é realizada utilizando “rosetas” rotativas, sem causar deformação na casca, enquanto outros possuem uma acção mais forte nas metades dos frutos, extraindo uma quantidade considerável de óleos essenciais, assim como outros líquidos da casca, sobretudo nos casos em que a extracção do sumo precede a extracção dos óleos essenciais.

Durante a linha de processo da *Food Machinery Corporation*, o sumo e as emulsões de óleo são tratados separadamente; também a polpa e as sementes são passadas por uma espiral em separado. O tratamento final para os óleos essenciais consiste numa tela vibrante para separar a emulsão oleosa, depois um clarificador centrífugo para concentrar a emulsão e

posteriormente uma polidora centrífuga para separar completamente os óleos essenciais da fase líquida. A fase líquida é depois colocada em circulação novamente e re-pulverizada no interior das máquinas, removendo o óleo extraído, formando outra emulsão. Dos extractores o sumo vai para colectores especiais que o passam para o finalizador. Aqui, o sumo, é separado de uma parte da polpa, fibras e sementes. O sistema, que funciona como um parafuso, em conjunto com o avanço contínuo do produto ao longo da máquina, asseguram que as peneiras são mantidas e o sumo flui rapidamente. Uma redução no conteúdo da polpa pode ser obtida através de um separador centrífugo.

Nos sumos obtidos, especialmente os reservados para embalamento imediato, tem que lhes de ser retirado o óleo e o ar. Uma grande quantidade de óleos essenciais nos sumos pode prejudicar a qualidade, seguindo a alteração de outros dos seus compostos. Entre outras coisas, a remoção do ar melhora a o perfil térmico e permite que os recipientes finais sejam cheios uniformemente.

Após a remoção do ar, o sumo tem de ser pasteurizado. Para que a acção do calor não danifique as características do sumo, é necessária a utilização da pasteurização-flash; isto é, a pasteurização é efectuada em menos de um minuto. A pasteurização é geralmente realizada utilizando pasteurizadores de placas, que funcionam pela passagem do sumo numa camada fina entre duas placas concebidos especialmente. A troca de calor é efectuada utilizando pratos de aço-inoxidável aquecidos por um fluido (água quente ou baixa pressão de vapor) que circula em contra-corrente.

Uma vez que a limonina e a naringina, mas também outros flavonóides, estão contidos na sua maioria na casca e nas membranas, a sua concentração no sumo depende também do sistema de processamento do fruto. Um esmagamento forte num extractor de sumo aumenta o rendimento de sumo obtido do fruto, mas aumenta também a quantidade de compostos amargos que passam das partes sólidas do fruto para o líquido.

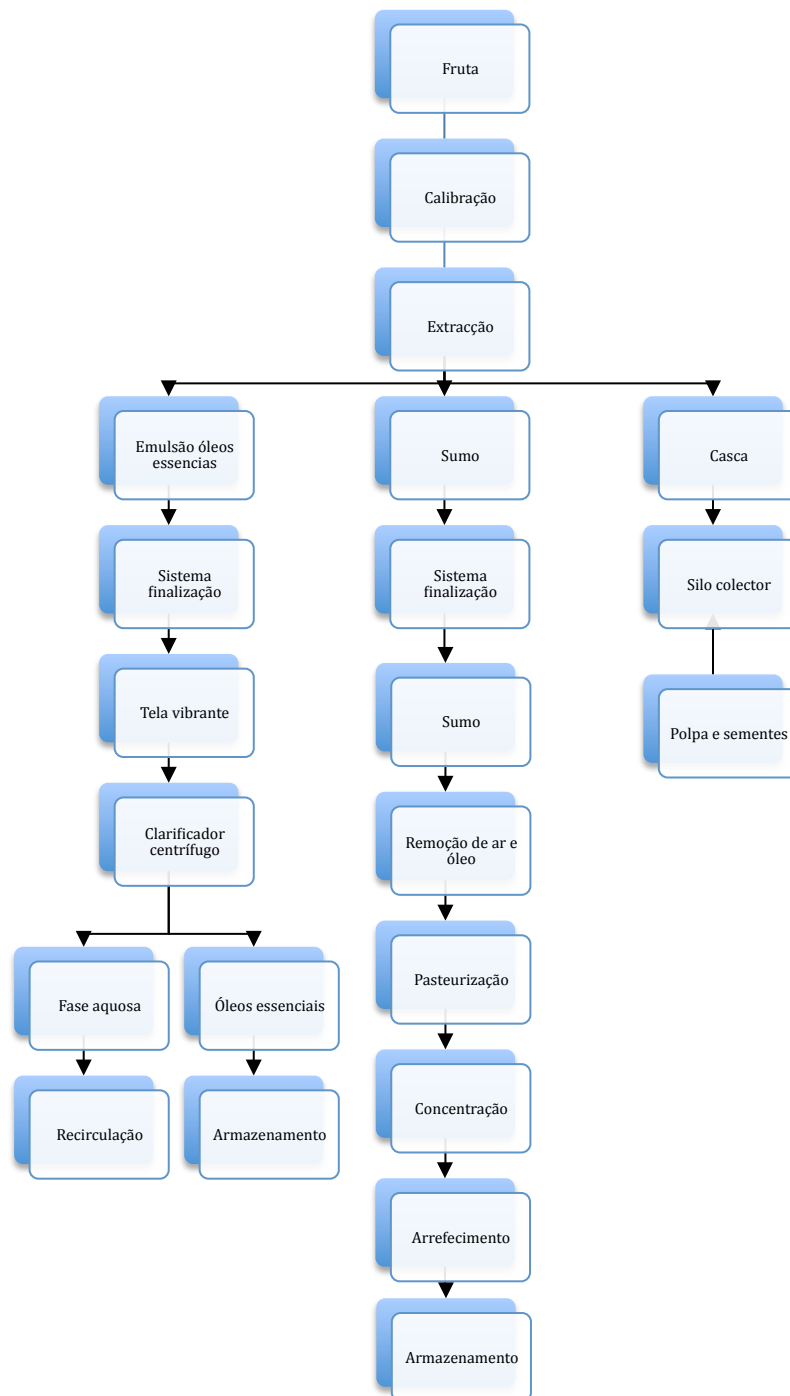


Figura 2.4. Fluxograma demonstrativo do processamento para uma utilização primária de frutos citrinos. Adaptado de [24].

À parte dos líquidos referidos anteriormente, a água fria é também utilizada, para trazer o sumo para a temperatura ambiente; obtém-se uma economia no balanço térmico utilizando o calor libertado do sumo

pasteurizado para começar o aquecimento do sumo que está para ser pasteurizado. Quando o sumo se encontra preparado para ser embalado, o sumo não passa por uma fase de arrefecimento: isto permite que o sumo seja embalado a uma temperatura de cerca de 90 °C. Obviamente, estando as embalagens seladas, podem ser rapidamente arrefecidas.

Os concentradores de vapor podem ser agrupados em duas categorias:

1. Concentradores que trabalham a baixas temperaturas, em que o consumo de vapor de água e de água tem importância relativa;
2. Concentradores rápidos que trabalham a altas temperaturas, com consumo reduzido de vapor de água e água.

Recentemente, uma segunda categoria de concentradores tem tido uma utilização mais difundida. Em particular, o evaporador FMC TASTE (*thermally accelerated short time evaporator*) é, provavelmente, o único evaporador desenhado e construído para sumos citrinos. O sumo natural é “bombeado” para o evaporador, após um ciclo de pré-aquecimento, um estadio de evaporação inicial, é pasteurizado e estabilizado. Durante a evaporação o sumo é nebulizado para dentro do Tube Nest a uma velocidade bastante elevada, expandindo-se no separador rapidamente. A evaporação do sumo ocorre numa única passagem por um certo número de estadios. A máquina pode também estar equipada com um sistema recuperador de aroma, onde os aromas são extraídos do sumo e concentrados 150 vezes antes da pasteurização. Antes de abandonarem o evaporador, o sumo concentrado passa no arrefecimento flash, que reduz a temperatura para os 10 °C.

Um aumento da qualidade do sumo é conseguido pela operação da poda: o concentrado produzido é refrigerado a uma temperatura perto da temperatura de congelação, colocado em tanques com uns refrigeradores duplos e posteriormente é adicionado sumo fresco até atingir 42° Brix.

Antes do enchimento final das embalagens, o sumo é enviado para tanques onde a normalização dos sumos é realizada caso necessário, e o sumo é arrefecido até cerca de -6 °C, ou no mesmo tanque ou num refrigerador contínuo do tipo “Votator”.

Por fim, o sumo concentrado é colocado em embalagens para um

sistema de controlo de precisão do peso da embalagem.

A produção de óleos essenciais, de sumo natural ou concentrado e a casca completam as fases fundamentais do processamento primário dos citrinos.

A estas fases descritas anteriormente deve ser adicionado o processamento que pode ser realizado na mesma planta ou noutras plantas. Acima de todas as utilizações dos frutos e, particularmente, do material recusado e da casca, a partir do qual, por meio de vários procedimentos, outros produtos importantes podem ser obtidos [24].

2.3. Supressão da limonina de sumos

2.3.1. Adsorção

Diversas tentativas foram já feitas para remover os compostos amargos do sumo de laranja Navel [26]. O gosto amargo por vezes presente nos sumos de citrinos deve-se fundamentalmente à presença excessiva de duas substâncias: naringina e limonina. A limonina está sobretudo presente no sumo de laranja, a limonina e naringina no sumo de toranja, mas também em outros sumos de citrinos. Quando a concentração de limonina ultrapassa 5 mg/L e a de naringina 500 mg/L, o sabor amargo torna-se perceptível e, a uma concentração mais elevada, o sumo adquire um sabor amargo evidente [26].

Várias tecnologias foram propostas para diminuir o sabor amargo em produtos derivados dos citrinos e demonstrando a importância que este problema coloca para os produtores e para o mercado de consumo de produtos e derivados dos citrinos. O tratamento do sumo com enzimas para hidrolisar o composto amargo, a naringina, a compostos não amargos foi já executado com sucesso [27].

De salientar entre as várias técnicas utilizadas para reduzir o teor de limonóides em sumos de citrinos a adsorção, a adição de agentes

supressores do sabor amargo (como por exemplo, ciclodextrinas), o tratamento pós colheita dos frutos com etileno, antecedendo o processamento, ou a biodegradação por enzimas ou células. Todos estes métodos têm várias desvantagens, uma vez que o sabor e outros parâmetros podem ser modificados, diminuindo a qualidade global do sumo.

A adsorção tem vindo a ganhar uma aceitação crescente para a remoção de produto em larga escala a partir de líquidos, devido à baixa energia envolvida nos processos de separação adsorptivos, principalmente quando comparada com outros métodos, nomeadamente a destilação e a extracção por solventes de soluções aquosas diluídas.

Além disso, a maioria destes processos mais convencionais baseiam-se apenas numa única diferença nas propriedades físico-químicas (carga electrostática, polaridade, tamanho molecular, solubilidade, entre outras), sendo por vezes imperativo recorrer a técnicas alternativas que apresentem maior selectividade.

A adsorção é um processo físico-químico que envolve transferência de massa de um soluto (adsorvato) da fase líquida para a superfície de um sólido (adsorvente) até que o equilíbrio seja atingido. As moléculas de adsorvato são retidas à superfície do adsorvente por forças de Van der Waals, formando uma monocamada ou multicamadas de moléculas [28].

Uma vez que a adsorção é um fenómeno de superfície, é importante que os adsorventes proporcionem uma grande área superficial externa e interna associada à sua estrutura porosa. A capacidade de adsorção depende, portanto, do tipo e tamanho dos poros, bem como da sua distribuição, e da natureza da superfície do adsorvente [29, 30].

Contudo, quando a adsorção é utilizada no processo de remoção de compostos amargos, as maiores dificuldades estão relacionadas com a necessidade de remoção de limonina, naringina e outras substâncias amargas de sumos, sem remover o seu conteúdo em açúcares, carotenóides e vitamina C [30].

Existem vários tipos de adsorventes disponíveis para utilização a nível

industrial, sendo que entre os mais utilizados pela indústria dos citrinos figuram, o carvão activado, as resinas de permuta iónica e as resinas poliméricas neutras.

A utilização de carvão activado no processamento de citrinos está geralmente associada à produção de sumos clarificados. Nestes casos, o tratamento ocorre em massa, depois da acção das enzimas, quer naturalmente presentes no sumo, quer adicionadas, necessárias à destruição da pectina. São também adicionados ao sumo agentes flocculantes e, se necessário, com carvão activado na forma de pó. Para remoção do carvão o sumo é filtrado.

Quando produtos cítricos com material em suspensão são processados com carvão activado, este deve ser empregue na forma de granulado [24].

A operação de remoção de substâncias amargas é conduzida em leito fixo, fazendo passar o sumo por uma camada de carvão de pelo menos 1 metro de altura, colocada em recipientes de aço inoxidável. Cada unidade de tratamento inclui dois recipientes desfasados, trabalhando alternadamente, um na fase de remoção das substâncias amargas e outro na fase de lavagem e regeneração, por forma a executar um processo semi-contínuo. A técnica utilizada é basicamente igual à empregue nas resinas adsorventes. A polpa não deve ser levada a centrifugação em percentagens superiores a 1%, não sendo necessário muita atenção com a quantidade de óleos essenciais presentes no líquido a tratar, já que a capacidade adsorvente do carvão não é afectada por ela [24].

Uma vez que o carvão activado tem uma massa específica que é o dobro da das resinas adsorventes utilizadas na indústria (2,0-2,2 em vez de um valor ligeiramente superior a 1), a remoção da polpa, dos grânulos de carvão não é uma operação difícil. É apenas necessário ter uma pressão de água suficiente na lavagem. As perdas de carvão conjuntamente com a polpa são limitadas [24].

A acção do carvão activado não é apenas devida à acção adsorvente das forças de Van der Waals. Os complexos carbono-oxigénio, que tornam a superfície do carvão ligeiramente polar, têm simultaneamente uma acção oxidativa sobre polifenóis e antocianinas. De facto, o carvão activado tem

também uma acção descolorante [24].

A alternativa à utilização de carvão activado para remoção de substâncias amargas de produtos cítricos constitui-se por resinas. Utilizam-se sobretudo adsorventes hidrofílicos do estireno-divinilbenzeno. São resinas macro-porosas, aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de produtos alimentares, com área de superfície superior a 700 m²/g (em resina seca). Nos E.U.A. a utilização de resinas adsorventes para o tratamento de produtos de citrinos é legal sem obrigatoriedade de menção no rótulo do produto [31]. Desde 1997 que também a Itália deu o exemplo a nível europeu, é permitindo como tratamento físico de sumos de frutas, a utilização de resinas [24].

As resinas de permuta iónica são polímeros reticulados, tendo geralmente como matriz o poliestireno, que é um material plástico solúvel em vários solventes. O agente reticulante é o divinilbenzeno (DVB) que torna o material insolúvel e consoante a quantidade presente na estrutura, determina a porosidade da matriz, o grau de *swelling* e a mobilidade de iões na resina.

As resinas poliméricas neutras possuem uma estrutura altamente porosa e são dimensionalmente e quimicamente estáveis e inertes em vários os ambientes. As suas propriedades de adsorção dependem das suas estruturas químicas e características de superfície. Este tipo de resinas apresenta a capacidade de adsorver e depois desadsorver uma grande variedade de espécies diferentes conforme o ambiente em que são utilizadas. Assim, em solventes polares como a água, as resinas neutras exibem um comportamento hidrofóbico ou não polar, e podem adsorver espécies orgânicas que sejam pouco solúveis, sendo esta polaridade mais pronunciada nos adsorventes de matriz de poliestireno [32].

Ao longo dos anos, estes adsorventes têm vindo a ser desenvolvidos para oferecer a força mecânica necessária, uma elevada área de superfície para adsorção e o tamanho de poro apropriado para transporte rápido. Uma das potenciais vantagens destes adsorventes é a sua baixa toxicidade [33].

Como o mecanismo de adsorção está ligado às forças de Van der Waals entre a superfície da resina e os compostos fenólicos, esta ligação

pode ser quebrada por soluções alcalinas [33].

2.3.2. Isotérmicas de Adsorção

A partição do soluto entre a fase fluida e a fase adsorvida envolve um equilíbrio de fases baseado em princípios termodinâmicos. A maneira mais comum de descrever este equilíbrio é expressar a quantidade de soluto adsorvido por quantidade de adsorvente (q) em função da concentração do soluto em solução (C) à temperatura constante. Uma expressão deste tipo designa-se por isotérmica de adsorção [34]. Este tipo de representação é muito útil na selecção do adsorvente mais adequado e ainda na previsão da *performance* dos sistemas de adsorção [35].

Existem aspectos importantes a considerar quando se interpreta uma isotérmica, nomeadamente a sua forma, a taxa de adsorção, o significado do *plateau* (quando presente), o efeito da temperatura e a natureza da interacção entre o adsorvato e o adsorvente.

As isotérmicas de adsorção de compostos biológicos são vulgarmente descritas pelos modelos de Freundlich ou Langmuir.

A equação empírica do modelo de Freundlich é expressa por [36]:

$$q_e = k_f C_e^n \quad (\text{Eq. 1})$$

Na equação 1, q_e é a concentração no equilíbrio de adsorvato à superfície do adsorvente; C_e é a concentração no equilíbrio do soluto na fase líquida; k_f e n são parâmetros determinados experimentalmente e característicos do sistema de adsorção. k_f é uma constante, cujas unidades dependem do valor de C_e , e que aumenta com a capacidade total de adsorção do adsorvente. O expoente n (adimensional) pode variar ao longo do processo de adsorção e está relacionado com a eficiência da adsorção e ainda com a sua energia. Uma adsorção favorável corresponde a valores de n inferiores a 1, enquanto valores superiores a 1 indicam um processo de adsorção desfavorável [35].

A isotérmica de Freundlich tem sido utilizada correntemente visto ser um modelo matemático simples que se pode adequar a processos de adsorção não lineares. No entanto, este modelo não considera um limite para a capacidade de adsorção do adsorvente, e portanto, teoricamente, a quantidade de soluto adsorvido tende a ser infinito à medida que a concentração de soluto na fase líquida aumenta.

A equação que representa a isotérmica de Langmuir é a seguinte [36]:

$$q_e = q_{\max} \cdot C_e / (k_L + C_e) \quad (\text{Eq. 2})$$

Na equação 2, k_L é uma constante de equilíbrio determinada experimentalmente para o processo de adsorção. Este modelo de isotérmica assume que:

- As moléculas adsorvidas formam uma monocamada à superfície do adsorvente;
- Cada local de adsorção é equivalente relativamente à energia de adsorção;
- Não ocorrem interacções entre moléculas adjacentes adsorvidas.

Contrariamente ao modelo de Freundlich, a isotérmica de Langmuir e os locais de adsorção são limitados.

No entanto, para a maioria dos sistemas de adsorção, ocorrem interacções entre moléculas adsorvidas, o que conduz a outros perfis de isotérmicas [36]. Em situações menos comuns, são observadas isotérmicas côncavas, que correspondem a sistemas desfavoráveis visto que se obtêm pequenas quantidades de soluto adsorvido.

A forma da isotérmica é um indicador do processo de adsorção como favorável ou não, e pode ser avaliada em termos de R_L , uma constante referida como factor de separação ou parâmetro de equilíbrio. R_L é calculado pela seguinte equação [33, 37]:

$$R_L = 1 / (1 + K_L^{-1} \cdot C_e) \quad (\text{Eq. 3})$$

2.3.3. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacáridos cíclicos. Existindo três tipos α -ciclodextrinas, β -ciclodextrinas e γ -ciclodextrinas, normalmente referidas como ciclodextrinas de 1ª geração [38].

As ciclodextrinas consistem em unidades de glucopiranosose unidas por ligações α - (1-4). As α -ciclodextrinas são compostas por 6 destas unidades, as β -ciclodextrinas por 7 e as γ -ciclodextrinas incluem 8 unidades de glucopiranosose. Estas moléculas são produzidas como resultado de uma reacção de transglicosilação intramolecular da degradação do amido pela enzima ciclodextrina glucanotransferase (CGTase). As β -ciclodextrinas são as mais acessíveis, de custo mais económico e, geralmente, de maior utilidade [38].

Foram pela primeira vez descobertas em 1891, quando uma pequena quantidade de um material cristalino foi obtida após a digestão do amido por *Bacillus amylobacter*. Contudo, apenas em 1935 a primeira γ -dextrina foi isolada. Posteriormente, em 1942 as estruturas das α e β -ciclodextrinas foram determinadas por cristalografia raio X, a que se seguiu γ -ciclodextrina em 1948 tendo também sido reconhecido que as ciclodextrinas podem formar complexos de inclusão.

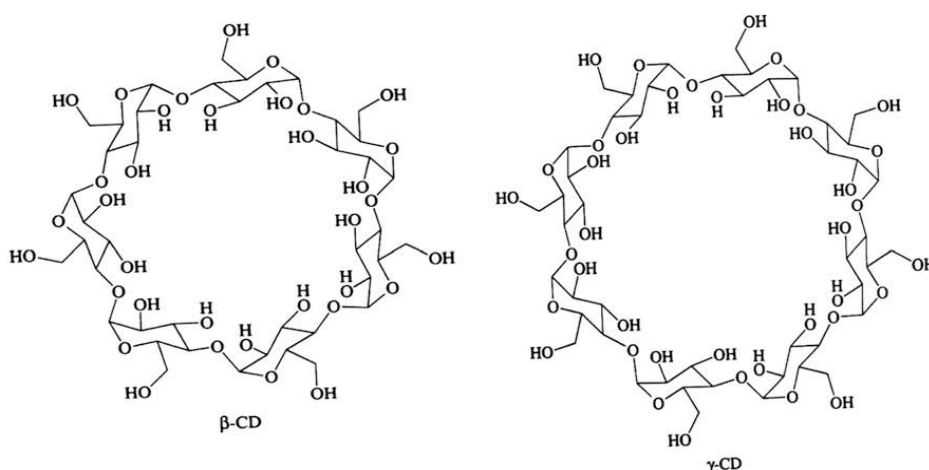


Figura 2.1. Estruturas químicas da β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina. Adaptado de [1]

Através da análise das estruturas de raio X, verificou-se que a

molécula possui um exterior hidrofílico, capaz de se dissolver na água, com uma cavidade apolar, o que proporciona uma matriz hidrofóbica, descrita como um “ambiente micro heterogéneo” [38].

Como resultado desta cavidade, as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hidrofóbicas. Uma ou duas moléculas de inclusão podem ser alojadas por uma, duas ou três ciclodextrinas [38].

2.3.3.1. Formação de complexos de inclusão

O principal interesse nas ciclodextrinas reside precisamente na sua capacidade de formar complexos de inclusão com vários compostos e com uma ampla gama de moléculas sólidas, líquida ou gasosas, por complexação molecular [38, 39].

Nestes complexos, a molécula de inclusão é mantida no interior da cavidade da ciclodextrina. A formação do complexo é uma adaptação dimensional entre a cavidade “hospedeira” e a molécula de inclusão. A cavidade lipofílica da ciclodextrina proporciona o microambiente favorável a que moléculas não polares de tamanho apropriado possam entrar para formar complexos de inclusão.

Não são quebradas ou formadas ligações covalentes durante a formação dos complexos de inclusão [38, 39].

As moléculas de água são removidas por moléculas de inclusão mais hidrofóbicas presentes em solução para obter uma associação apolar-apolar e diminuir a tensão anelar da ciclodextrina resultando num estado energético mais baixo e estável [39].

A ligação da molécula de inclusão no interior da ciclodextrina não é fixa ou permanente mas antes um equilíbrio dinâmico. A força de ligação depende do nível de “encaixe” entre a molécula e a ciclodextrina e das interacções específicas locais entre os átomos de superfície. Os complexos podem ser formados quer em solução quer no estado cristalino, sendo tipicamente a água o solvente de eleição.

A arquitectura das ciclodextrinas confere-lhes uma ampla gama de propriedades químicas, marcadamente diferentes daquelas exibidas por

outros carboidratos não cíclicos com o mesmo peso molecular.

2.3.3.2. Aplicações das ciclodextrinas na encapsulação de sabores

A inclusão em ciclodextrinas exerce um profundo efeito nas propriedades físico-químicas das moléculas de inclusão, já que estas são temporariamente fechadas ou retidas na cavidade da ciclodextrina, dando oportunidade a modificações benéficas nas propriedades da molécula [1].

Uma vez que cada molécula de inclusão se encontra individualmente rodeada por ciclodextrinas, a molécula é micro encapsulada, do ponto de vista microscópico. Este facto pode levar a modificações vantajosas nas propriedades físicas e químicas das moléculas, tais como: a estabilização de substâncias sensíveis a luz ou ao oxigénio, a modificação da reactividade química das moléculas de inclusão, a fixação de substâncias muito voláteis, a melhoria da solubilidade das substâncias, a modificação de substâncias líquidas para pós, a protecção contra a degradação de substâncias por microrganismos, o mascaramento de odor e sabores desagradáveis, o mascaramento de pigmentos ou coloração de substâncias e da actividade catalítica das ciclodextrinas com as moléculas [38, 40, 41].

Verifica-se que as ciclodextrinas têm ampla aplicabilidade nos campos da indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, protecção ambiental, bioconversão, embalagem e indústria têxtil [1, 40, 41].

A **temperatura** exerce mais do que um efeito sobre os complexos de ciclodextrinas. O aquecimento pode aumentar a solubilidade do complexo mas, em simultâneo, também destabiliza o mesmo. Estes efeitos frequentemente necessitam de ser ponderados.

Como a estabilidade térmica do complexo varia de molécula de inclusão para molécula de inclusão, a maioria dos complexos começa a decompôr-se a 50-60 °C, enquanto alguns complexos são mais estáveis a temperaturas superiores, especialmente se a molécula de inclusão se encontra fortemente ligada ou o complexo é altamente insolúvel.

A água é o **solvente** mais comumente utilizado. Quanto mais solúvel

é a ciclodextrina no solvente, mais moléculas ficam disponíveis para complexação. A molécula de inclusão tem de ser capaz de deslocar o solvente da cavidade da ciclodextrina, caso o solvente forme um complexo com a ciclodextrina. A água, por exemplo, é facilmente deslocada. Contudo, nem todas as moléculas de inclusão são solúveis em água, tornando a complexação ou muito lenta ou impossível. Nestes casos, a utilização de um solvente orgânico para dissolver a molécula pode ser necessária. O solvente não deverá complexar bem com a ciclodextrina e deve ser facilmente removido por evaporação. Etanol e éter dietílico são bons exemplos destes solventes.

À medida que a quantidade de água aumenta, aumenta também a solubilidade da ciclodextrina e da molécula de inclusão, de forma a que a complexação ocorra mais rapidamente. Contudo, continuando a aumentar a quantidade de água, a ciclodextrina e a molécula podem ficar tão diluídas que não entram em contacto tão facilmente como aconteceria se estivessem mais concentradas em solução. Logo, é desejável manter a quantidade de água suficientemente baixa para assegurar que a complexação ocorre a um ritmo suficientemente rápido.

O sabor desempenha um importante papel na satisfação do consumidor e influencia o consumo posterior dos alimentos. Os processos de armazenamento e produção, materiais de embalagem e ingredientes nos alimentos causam muitas vezes modificações no sabor global por redução da intensidade dos compostos aromáticos ou por produção de outros componentes aromáticos [42].

Para limitar a degradação ou perda de aromas durante o processamento e armazenagem é benéfico encapsular os ingredientes voláteis antes da sua utilização em comida e bebidas.

As ciclodextrinas são utilizadas em formulações de géneros alimentícios para protecção do sabor. A maioria dos sabores naturais ou artificiais são óleos ou líquidos voláteis e a complexação com as ciclodextrinas proporciona uma alternativa promissora as convencionais tecnologias de encapsulação, utilizadas para protecção dos sabores.

As ciclodextrinas também são utilizadas como auxiliares de processos, como por exemplo, para remover o colesterol de produtos como o leite, manteiga e ovos [39, 41, 43, 44]. Outras aplicações derivam da sua capacidade para reduzir o sabor amargo, odor e sabor desagradáveis e para estabilizar sabores quando são sujeitos a armazenamento de longa duração [1, 45].

Desta forma, as ciclodextrinas podem ser utilizadas para a remoção ou mascaramento de componentes indesejáveis. Alguns alimentos têm um odor peculiar, mas quando as ciclodextrinas são adicionadas durante a sua produção, estes componentes formam complexos que melhoram o odor do produto final. Por exemplo, este processo é utilizado para melhorar o odor do leite de soja e proteína de soja, e também para remover o odor particular do peixe [46].

No Japão, as ciclodextrinas foram aprovadas como “amido modificado” para aplicações em comida há mais de duas décadas, servindo para mascar odores na comida fresca e estabilizar óleos de peixe. Alguns países europeus, aprovaram também as ciclodextrinas para uso em determinadas aplicações, devido a sua baixa toxicidade [1].

Um sabor amargo é a principal razão para a rejeição de vários produtos alimentares, embora exceções a esta regra se encontrem em várias culturas. Como por exemplo para o café, a cerveja e o vinho, e de esperar algum sabor amargo.

A complexação das ciclodextrinas com agentes adoçantes, como o aspartame estabiliza e melhora o sabor. Também elimina o sabor residual desagradável de outros adoçantes. As próprias ciclodextrinas são um promissor novo adoçante. O melhoramento do sabor por ciclodextrinas também já foi reclamado para utilização em bebidas alcoólicas, como o whisky e a cerveja [38].

Os polímeros de ciclodextrinas são úteis na remoção dos sumos de citrinos (limonina e naringina) compostos amargos por complexos de inclusão.

O sabor amargo excessivo é uma propriedade indesejável de alguns

sumos comerciais de laranja Navel e toranja [47].

2.3.3.3. Limitações e desvantagens

Os aspectos seguintes são limitações inerentes das abordagens físico-químicas utilizadas na remoção do sabor amargo:

- Os métodos alteram a composição química do sumo, quer através de reacções químicas ou da remoção de nutrientes, sabor, cor, etc.
- Os métodos eram inespecíficos e consequentemente, ineficientes, introduzindo variações de lote para lote devido a modificações indesejáveis ou não monitorizáveis, juntamente com as desejáveis.
- Os químicos utilizados em certos casos não podem ser reciclados, resultando no tratamento de resíduos poluentes com elevados custos.
- A remoção do amargo foi conseguida à custa de qualidade nutricional, textura, sabor, odor, cor ou estabilidade.
- Os métodos não eram reproduzíveis, e o rendimento era mais baixo, com perda parcial de nutrientes desejáveis.

2.4. Validação de métodos analíticos

A validação de métodos é uma etapa fundamental de um sistema de medições que os laboratórios devem implementar para que se produzam resultados credíveis [48].

De acordo com o “Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos”, NP EN ISO/IEC 17025:2005 [49], a validação de métodos é "a confirmação através de exame e apresentação de evidência objectiva de que requisitos específicos relativos a uma utilização pretendida são satisfeitos", consistindo na utilização de um conjunto de ensaios analíticos que permitam estabelecer as características de desempenho do método, de forma a verificar se as mesmas estão de acordo com as especificações aplicáveis, demonstrando portanto que o método é adequado para a utilização pretendida [50].

A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planeamento de uma estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu

desenvolvimento. A validação deve ser iniciada após um período inicial de conhecimento do método a validar, no qual os operadores adquirem conhecimentos sobre as condições de manuseamento e armazenamento das amostras, preparação de reagentes, realização dos ensaios, procedimentos de controlo da qualidade e interpretação dos resultados [50].

Os métodos de ensaio podem ser métodos normalizados ou métodos internos. Um método normalizado é um método de ensaio que segue o que se encontra indicado numa norma de ensaio ou documento normativo equivalente. Assume-se que estes métodos foram devidamente validados, estão sujeitos a actualização periódica e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional.

A selecção e implementação de um método com determinadas características ou aplicado a uma determinada matriz alimentar é mais fácil quando existe um método normalizado. Os métodos normalizados são geralmente validados através da realização de ensaios inter-laboratoriais e posteriormente transcritos para uma norma.

Um método interno é um método de ensaio que não segue uma norma de ensaio (nacional ou internacional) ou documento normativo equivalente e é geralmente validado internamente por um único laboratório [51].

A validação aplica-se a um procedimento analítico, o qual é utilizado na determinação de um analito ou conjunto de analitos (compostos alvo) presentes numa determinada matriz, numa gama de concentrações específica e utilizada com objectivos específicos. De um modo geral, a validação deve permitir verificar que o método apresenta um desempenho adequado ao fim a que se destina, na gama de trabalho do método para o analito e tipos de matrizes definidas no método de ensaio [48, 51].

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo, nalgumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Os erros associados às medições analíticas podem ter diferentes origens, nomeadamente [48, 51]: erros aleatório de medição (afectam a repetibilidade), efeito da corrida (considerado como resultante do "bias" de uma corrida e da variação aleatória entre as várias corridas ou séries de

trabalho), efeito do laboratório (considerado como o "bias" de um único laboratório), "Bias" do método, efeito de matriz.

A componente de erro associada à repetibilidade inclui contribuições de erros volumétricos, gravimétricos e de heterogeneidade do material de teste e são avaliados com base na dispersão dos resultados da análise de réplicas.

O efeito da corrida contribui com um efeito adicional de variação entre dias, associado, por exemplo, à mudança do operador, mudança de lotes de reagentes, recalibração do equipamento e alterações ambientais (por exemplo, mudança de temperatura).

As variações associadas ao laboratório resultam de factores relacionados, por exemplo, com variações de padrões, reagentes, equipamentos e de condições ambientais. As diferenças entre laboratórios são avaliadas através de estudos colaborativos entre laboratórios ou através da participação em ensaios interlaboratoriais, se aplicável [48, 51].

No caso da validação de um método interno cabe ao laboratório decidir qual o grau de exigência necessário, definindo quais os parâmetros de desempenho do método que devem ser caracterizados durante a validação, tendo em conta o fim a que se destina o método a validar [48]. Os requisitos de validação podem estar especificados em directivas, normas ou guias, que sempre que possíveis devem ser seguidos.

Quando se pretende validar um método interno de ensaio ter-se-á de efectuar a sua descrição e caracterização. A descrição dos métodos internos de ensaio deve ser feita em documentos, de forma detalhada e de modo a que qualquer pessoa com preparação adequada o possa executar. Estes documentos deverão conter os mesmos elementos que uma norma, nomeadamente, os elementos identificativos do documento, os elementos descritivos do método e os elementos bibliográficos e normativos [50, 51].

Sempre que um laboratório pratica métodos internos de ensaio terá que instruir um processo de validação desses métodos, que inclua todos os registos obtidos. A validação deve ser adaptada a cada caso [48, 51].

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros [51]:

- Linearidade/Gama de trabalho.
- Limiares analíticos (limite de detecção e de quantificação).
- Sensibilidade.
- Precisão.
- Exactidão.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação indirecta (linearidade/gama de trabalho, limiares analíticos, sensibilidade e precisão) e por avaliação directa (exactidão) e deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por organismo reconhecido [51].

2.4.1. Especificidade/Selectividade

A especificidade de um método diz respeito ao grau ou à capacidade que esse método possui em distinguir a substância a analisar de outras substâncias, tais como impurezas, produtos de degradação, ou outros componentes da amostra (matriz). Esta característica depende, essencialmente, da técnica de medição descrita, podendo variar de acordo com o tipo de composto ou de matriz.

Consoante o tipo de ensaio assim o termo especificidade pode apresentar várias abordagens ou implicações, [51]:

- Testes de identificação: assegurar a identidade do analito.
- Testes de pureza: assegurar que todos os métodos analíticos utilizados permitem a determinação exacta do teor de impurezas do analito (e.g., teste das substâncias análogas, limite de metais pesados, limite de impurezas orgânicas voláteis).
- Doseamento: assegurar um resultado exacto, o qual avalia o teor do analito na amostra.

Na análise qualitativa (testes de identificação) deve ser demonstrada a capacidade do método para identificar o analito na presença de compostos de estrutura química semelhante que possam estar presentes. Esta capacidade pode ser demonstrada obtendo resultados positivos (nomeadamente por comparação com um material de referência conhecido) em amostras que contêm o analito, associadas a resultados negativos de amostras que não contêm o analito, e pela confirmação de que não se obtém uma resposta positiva com substâncias estruturalmente semelhantes ou análogas à do analito [51].

Nos métodos analíticos de doseamento de impurezas, a especificidade pode ser demonstrada fortificando o analito ou o produto com quantidades apropriadas de impurezas e demonstrando que estas impurezas são determinadas com precisão e exactidão aceitáveis.

Nos doseamentos, a demonstração da especificidade requer que seja demonstrado que o processo não é afectado pela presença de impurezas. Na prática, isto pode ser realizado através da fortificação da amostra com quantidades apropriadas de impurezas, demonstrando que o resultado do doseamento não é afectado pela sua presença. Neste caso, os resultados são avaliados por comparação com a recuperação esperada se não houvesse interferência, ou seja, 100 %.

A especificidade, no caso de métodos cromatográficos também pode ser demonstrada através dos valores da resolução de dois picos cromatográficos com tempos de retenção muito próximos [51].

2.4.2. Curvas de calibração

Em ensaios quantitativos a calibração é um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou quantidade conhecida de uma substância. Envolve a preparação de uma série de soluções padrão, de concentrações conhecidas, que são analisadas nas mesmas condições a aplicar à análise de amostras [51].

É recomendada a norma ISO 8466-1 [52] como referência para calibrações analíticas, designadamente para efectuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados. Quando a curva de calibração

representa uma função polinomial do primeiro grau, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da recta.

De acordo com a norma ISO 8466-1 [52], são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, e a sua distribuição ao longo da gama de concentração deve ser equidistante. Quando não é efectuada a curva de calibração de todas as vezes que se analisa uma série de amostras, o laboratório deve definir um processo para verificação da validade da curva usada, face a critérios de aceitação de desvios. Devem existir critérios para aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e estabilidade entre calibrações, definidos internamente, nomeadamente evidenciar a estabilidade da curva através de um histórico de curvas de calibração.

2.4.3. Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade de deduzir resultados de ensaios que são directamente, ou através de uma dedução matemática bem definida, proporcionais à concentração de analito nas amostras dentro de um dado intervalo de concentração. A forma mais simples de observar a linearidade é através da representação gráfica da resposta de uma medida vs a concentração ou quantidade da substância conhecida (curva de calibração) [51].

Existem vários parâmetros para avaliar a linearidade incluindo os coeficientes de correlação e de determinação. No entanto, estes não devem ser utilizados de forma isolada para avaliar a linearidade uma vez que são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade. Outros testes de avaliação da linearidade incluem o teste das áreas normalizadas, o teste de análise de resíduos e o teste de RIKILT [53]. Para efectuar estes testes aplicam-se as fórmulas descritas nos anexos 1, 2 e 3.

A linearidade deve ainda ser avaliada de acordo com o modelo estatístico definido na norma ISO 8466-1 [52], tal como descrito no anexo 4. Este teste de linearidade designa-se por teste de Fisher-Snedecor ou teste de Mandel e

baseia-se na comparação das variâncias obtidas a partir dos desvios padrão residuais da função de calibração linear e da função de calibração não linear. Os valores obtidos da curva de calibração são utilizados para calcular a função de calibração linear e a função de calibração não linear bem como os respectivos desvios padrão residuais. Partindo destes valores calcula-se o valor de VT (valor teste) que é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para $n-1$ graus de liberdade e uma probabilidade de 95 %:

- Se, $VT \leq F$, então a função de calibração é linear
- Se, $VT > F$, então a função de calibração não é linear

2.4.4. Gama de Trabalho

A gama de trabalho pode ser definida como o intervalo entre a concentração inferior e superior do analito na amostra, para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um adequado nível de precisão e exactidão [51, 52]

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias [52]. Se $VT \leq F(n-1, n-1; 0,99)$ a diferença entre as variâncias não é significativa, então a gama de trabalho está bem ajustada [50].

2.4.5. Limiares analíticos

Os limiares analíticos do método incluem o limite de detecção e o limite de quantificação.

2.4.5.1. Limite de Detecção (LOD)

O LOD representa o teor mínimo medido a partir do qual é possível determinar a presença de um determinado analito, sem no entanto existir certeza estatística suficiente para se poder quantificar com exactidão [50].

O limite de detecção pode ser matematicamente definido por:

$$LOD = 3 \times S_{xo} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

S_{xo} Desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com a concentração mais baixa da gama de trabalho

Quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, o limite de detecção é calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a expressão:

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

$S_{y/x}$ Desvio padrão residual da curva de calibração

b Declive da curva de calibração

2.4.5.2. Limite de Quantificação (LOQ)

O LOQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exactidão e precisão aceitáveis. Pode ser calculado através da expressão:

$$LOQ = 10 \times S_{xo} \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que:

S_{xo} Desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com a concentração mais baixa da gama de trabalho

Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação é calculado da seguinte forma:

$$LOD = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que:

$s_{y/x}$ Desvio padrão residual da curva de calibração

b Declive da curva de calibração

2.4.6. Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente a esse acréscimo [52].

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Eq. 8})$$

Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito.

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa recta de calibração [50].

2.4.7. Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de conformidade (concordância) entre os resultados individuais dos ensaios, quando o processo é aplicado repetitivamente a amostras múltiplas de uma amostra homogénea. A precisão de um método analítico é usualmente expresso através do desvio-padrão ou desvio-padrão relativo (coeficiente de variação). A precisão é uma medida de grau de reprodutibilidade de um método analítico em condições normais de execução e está associada aos erros acidentais ou aleatórios [49, 51].

Os estudos de precisão incluem a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade.

2.4.7.1. Repetibilidade

A repetibilidade corresponde a uma estimativa da precisão obtida quando os resultados das medições são obtidos num único laboratório, por um único operador, utilizando o mesmo equipamento, durante um curto espaço de tempo. A repetibilidade dá uma indicação da variabilidade que ocorre num curto espaço de tempo e é geralmente usada para estimar as diferenças prováveis entre resultados de réplicas obtidas durante a análise de um mesmo lote ou série analítica [51].

A precisão em condições de repetibilidade é normalmente expressa em termos de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 401/2006 [54], repetibilidade (r) define-se com o "valor abaixo do qual se pode esperar que o valor absoluto da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de repetibilidade, nomeadamente a mesma amostra, o mesmo operador, os mesmos aparelhos, o mesmo laboratório e um intervalo curto, se situe dentro de limites específicos de probabilidade (normalmente 95%), sendo [51]:

$$r = 2,8 \times S_r \quad (\text{Eq. 9})$$

onde

S_r Desvio padrão, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) ou desvio padrão relativo da repetibilidade (DPR_r) para cada nível de concentração, expresso em percentagem é dado por [51]:

$$cv_r(DPR_r) = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

Em que

\bar{X} Concentração média do analito obtida em condições de repetibilidade

O uso de replicados permite a avaliação conjunta de fontes de incerteza relacionadas com a repetibilidade do método, nomeadamente:

- Volume de injeção.
- Integração dos sinais cromatográficos.
- Homogeneidade das amostras.
- Repetibilidade do detector.

Em rotina, a avaliação da precisão (repetibilidade) faz-se através da análise de duplicados. A percentagem (%) da diferença de duplicados (DD) é calculada através da seguinte equação:

$$DD(\%) = \frac{D}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

D Diferença entre a concentração de analito obtida na análise de duas réplicas, $|X_1 - X_2|$.

\bar{X} Concentração média de analito (análise das duas réplicas, X_1 e X_2).

2.4.7.2. Precisão intermédia

Expressa a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente as condições a variar (uma ou mais):

- Diferentes analistas
- Diferentes equipamentos
- Diferentes épocas
- Com/sem verificação da calibração

2.4.7.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade reflecte a precisão de um método analítico efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, mas fazendo variar certas condições tais como o operador, o equipamento, o laboratório e/ou o tempo, efectuando os

ensaios em intervalos de tempo mais ou menos longos. A reprodutibilidade de um método de análise é avaliada através participação em ensaios interlaboratoriais [51].

De acordo com o Regulamento (CE) nº 401/2006 [54] a reprodutibilidade (R_{prod}) define-se como o "valor abaixo do qual se pode esperar que o valor absoluto da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de reprodutibilidade, nomeadamente, com um material idêntico, realizado por operadores de laboratórios diferentes, utilizando o método de ensaio normalizado, se situe, dentro de um certo limite de probabilidade (normalmente 95%), de acordo com a seguinte equação:

$$R_{\text{Prod}} = 2,8 \times S_R \quad (\text{Eq. 12})$$

onde

S_R Desvio padrão, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade.

O coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R) ou desvio padrão relativo da reprodutibilidade.

$$CV_R (\text{DPR}_R) = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

Em que

\bar{X} Concentração média do analito obtida em condições de reprodutibilidade.

2.4.8. Exactidão

A exactidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro e está associada a erros sistemáticos.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de um método são:

- Utilização de Materiais de Referência Certificados (MRC).

- Participação em ensaios interlaboratoriais.
- Realização de testes comparativos.
- Realização de ensaios de recuperação.

Quando a exactidão é determinada com base em ensaios de recuperação, o analito é doseamento nas amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito em estudo, através da seguinte equação:

$$\text{Rec} = \frac{C_R V_R - C_A V_A}{C_P V_P} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

em que:

C_R – concentração do analito na amostra fortificada

V_R – volume de amostra do ensaio de recuperação ($V_A + V_P$)

C_A – concentração do analito na amostra não fortificada

V_A – volume de amostra utilizada no ensaio de recuperação

C_P – concentração do padrão de analito utilizado para fortificar a amostra

V_P – volume de padrão de analito utilizado no ensaio de recuperação

A exactidão deve ser avaliada em toda a gama de trabalho e no mínimo em 3 níveis de concentração, com 3 replicados diferentes por nível de concentração [55].

3. Materiais e Métodos

3.1. Adsorventes

As resinas sintéticas, “Amberlite™”, XAD-18, XAD-1600N e XAD-16N utilizadas nos ensaios de adsorção e as suas propriedades mais relevantes estão representadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Propriedades das resinas poliméricas

Resina polimérica	Estrutura química	Área de superfície (m ² /g)	Diâmetro médio da partícula (µm)	Diâmetro médio do poro (Å)	Bulk density (g/mL)	Capacidade de retenção de mistura (%)	Fornecedor
XAD™ 18	pStyDVB* aromática	≥ 800	425±50	150	0,69	-	Rohm & Haas
XAD™ 1600N	pStyDVB* aromática	≥ 700	400±50	150	0,66	66-73	Rohm & Haas
XAD™ 16N	pStyDVB* alifática	≥ 800	635±75	150	0,72	62-70	Rohm & Haas

*Polistireno-Divinilbenzeno

Nos ensaios de adsorção foram igualmente utilizadas ciclodextrinas, nomeadamente a β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, encontrando-se as suas principais propriedades listadas na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Propriedades das Ciclodextrinas

Propriedade	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
N.º de unidades de glucopirranose	7	8
Peso molecular (g/mol)	1135	1297
Solubilidade em água a 25°C (% m/v)	1.85	23.2
Diâmetro exterior	15.4	17.5
Diâmetro da cavidade	6.0-6.5	7.5-8.3
Fornecedor	Wacker Chemie AG	Wacker Chemie AG

3.2. Reagentes

Os reagentes utilizados no decorrer dos diferentes ensaios realizados, encontram-se identificados nas tabelas seguintes:

Tabela 3.3. Reagentes utilizados na análise por HPLC e nos outros métodos analíticos

Reagente	Grau de pureza	Fornecedor
Acetonitrilo	HPLC	Merck
Ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS)	Analítico	Merck
Hidróxido de Sódio	Analítico	Merck
Ácido metafosfórico	Analítico	Merck
Limonina	Analítico	Sigma
Bicarbonato de Sódio	Analítico	Merck
Ácido Ascórbico	Analítico	Merck
Tartarato de sódio e potássio	Analítico	Merck
2,6-diclorofenolindofenol	Analítico	Merck

3.3. Equipamento

A centrifugação do sumo foi realizada numa centrífuga Heraeus Biofuge Pico.

As pesagens foram efectuadas em balança analítica da marca Mettler AE200 (máx. 205 g \pm 0,1 mg).

As medidas de absorvência foram efectuadas em *Eppendorf BioPhotometer*.

A análise quantitativa da limonina foi efectuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), num cromatógrafo da marca HP, modelo HP series 1050, equipado com detector espectrofotométrico HP 1050, integrador HP 3395. bomba HP series 1050, injector manual Microliter™ Syringes de volume interno 100 μ L.

A coluna de HPLC utilizada foi da marca Merck, Lichrospher 100 RP-

18, com 15 cm de comprimento, de fase inversa, com empacotamento de sílica, de cadeias C18 e tamanho de partícula de 5 μm e as pré-colunas da marca e modelo Merck, RP-18.

Na preparação dos reagentes para HPLC, foi igualmente utilizado um aparelho de ultrassons da marca Pselecta modelo 513 para desgaseificação dos solventes empregues.

O sistema de filtração de solventes, era composto por bomba de vácuo KNF Aeromat, à qual se ligava um Kitasato com membranas filtrantes Gelman Milipore Corporation com porosidade 0,2 μm .

O banho de aquecimento é de marca Memmert.

Ao invés dos convencionais frascos *erlenmeyer*, foram utilizadas microplacas de 24 poços circulares (17 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade) para a realização de todos os ensaios (Fig. 3.1). Cada poço apresentava a capacidade de 3 mL. Esta escolha teve como objectivos: reduzir a variabilidade entre ensaios paralelos e minimizar a quantidade de soluções padrão e de sumo e o espaço necessário no agitador. Permitiu ainda uma manipulação mais rápida e prática do que com os frascos *erlenmeyer* [56].



Figura 3.1. Microplaca de 24 poços.

3.4. Métodos analíticos

Foram utilizados os seguintes métodos analíticos: método dinitrosalicílico (DNS) para avaliação dos açúcares redutores, determinação do ácido ascórbico (teor de vitamina C) e análise dos carotenóides.

As amostras a analisar foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente foram filtradas com filtros VWR *International*, 25 μm *Syringe Filter* – 0,45 μm (Nylon *membrane*).

3.4.1. Análise da Limonina

Para este estudo, adoptou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dada a sua sensibilidade, rapidez e resolução [18, 57].

A escolha do comprimento de onda para o estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas assim como a fase móvel que permitiu uma melhor separação entre os diferentes componentes do sumo e a respectiva proporção dos solventes nela utilizados foi baseada no estudo efectuado por Ribeiro et al. [29] em condições experimentais semelhantes, também para pesquisa e análise de limonina em sumo de laranja.

Técnica

O teor de limonina na amostra foi determinado por HPLC, utilizando um coluna de fase inversa (RP-C18), uma fase móvel isocrática (45 % de acetonitrilo e 55 % de água desionizada), a um fluxo constante de 1 mL/min a um comprimento de onda de 210 nm com um padrão externo de limonina por cada corrida. O padrão externo foi obtido por dissolução de 2,5 mg de limonina em 50 mL de acetonitrilo, dando origem a uma solução-mãe de 50 ppm, tendo posteriormente sido preparados padrões de concentração entre 1 e 10 ppm a partir dessa solução. Todos os solventes constituintes da fase móvel foram sempre filtrados através de filtros de membrana de polipropileno

hidrofílico de 0,2 μm .

A identificação do pico cromatográfico da limonina foi realizada por comparação do tempo de retenção do pico de interesse com o tempo de retenção do padrão de limonina utilizado (Fig. 3.2).

Os padrões de limonina foram obtidos pela dissolução de 0,5 mg de limonina em 10 mL de acetonitrilo.

Foi traçada a curva de calibração da limonina em função da área dos picos obtida após análise dos padrões de concentração entre 1 e 10 ppm. Para obtenção de cada ponto experimental foram efectuadas um mínimo de 3 injeções.

O pico cromatográfico da limonina foi identificado por comparação com os picos cromatográficos obtidos na injeção dos padrões de limonina relativamente ao tempo de retenção.

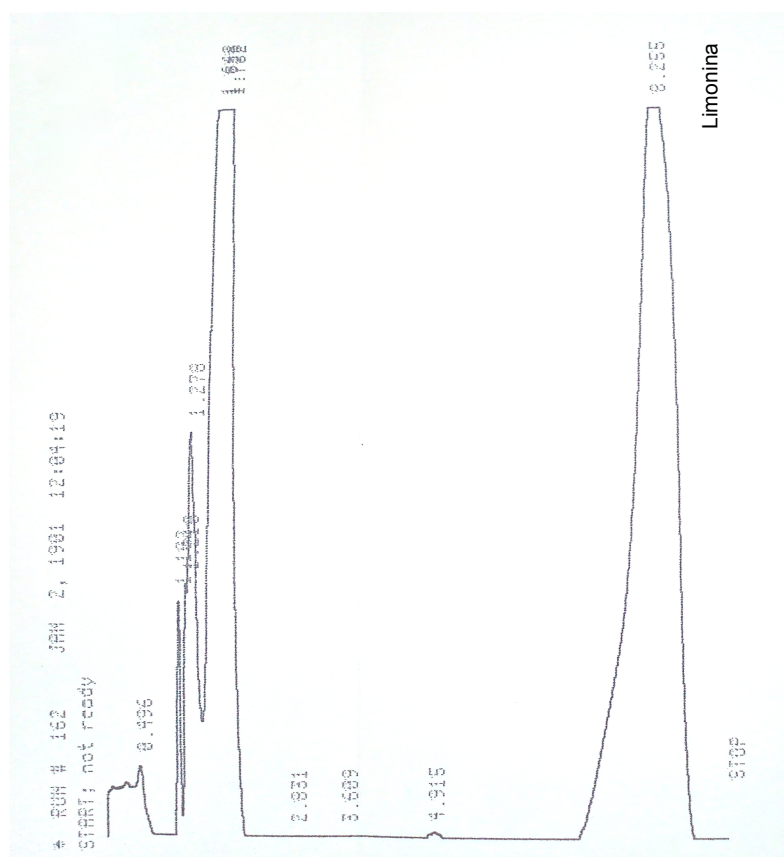


Figura 3.2. Cromatograma característico das análises quantitativas da limonina (pico identificado no tempo de retenção 8,255)

3.4.2. Determinação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) [58], adaptado a microescala [59]. Este método é utilizado para o doseamento de açúcares redutores e baseia-se na redução em meio alcalino do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico, com respectiva oxidação dos grupos carbonilo do açúcar presente, a carboxilo.

Reagente DNS

O ácido dinitrosalicílico foi obtido por dissolução, à temperatura ambiente, de 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 10 mL de hidróxido de sódio 2N (NaOH) e 250 mL de água destilada. Dissolveram-se posteriormente 150 g de tartarato de sódio e potássio (também designado por sal de La Rochelle), perfazendo o volume para 500 mL com água destilada. O reagente implica armazenamento em frasco escuro, ao abrigo da luz.

Técnica

Numa microplaca Nunclon™ Delta Surface de 96 poços foi adicionado em cada poço 85 µL de reagente DNS e 85 µL de amostra. A placa foi depois coberta com tampa e submetida a aquecimento em banho de água a uma temperatura de 100 °C durante um período de 5 minutos. Posteriormente foi arrefecida, também em banho de água, durante 20 minutos. A absorvência foi determinada a um comprimento de onda de 562 nm num Biofotómetro da Eppendorf com um limite de detecção 0,4 mM.

Na figura 3.3 é apresentada uma das curvas de calibração efectuadas para a análise dos açúcares redutores.

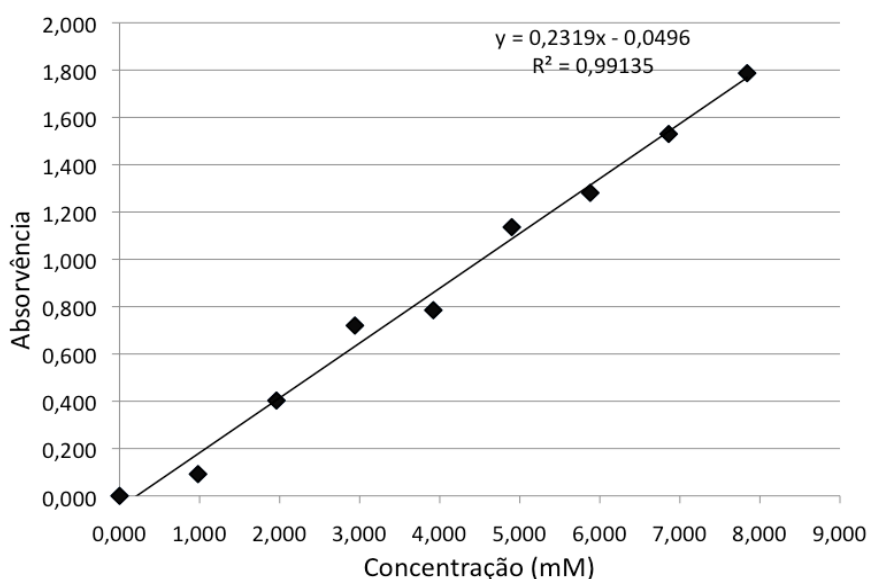


Figura 3.3. Curva Calibração da glucose pelo método DNS

3.4.3. Determinação do ácido ascórbico

Reagentes

Os reagentes a utilizar no método analítico, o ácido metafosfórico a 3% e a solução de 2,6-diclorofenolindofenol foram preparados previamente. Para a preparação do ácido metafosfórico a 3%, dissolveram-se 8,15 g de ácido metafosfórico em 21,74 mL de ácido acético e 250 mL de água destilada. A preparação da solução de 2,6-diclorofenolindofenol fez-se por dissolução de 105 mg de bicarbonato de sódio em 375 mL de água destilada, dando origem a uma solução aquosa de bicarbonato de sódio à qual foram adicionadas 130 mg de 2,6-diclorofenolindofenol num volume de 500 mL de água destilada.

Paralelamente foi preparada uma solução padrão de ácido ascórbico por dissolução de 50 mg de ácido ascórbico em 250 mL de solução de ácido metafosfórico a 3%.

Aferição e Padronização da solução de 2,6-diclorofenolindofenol

Dissolveram-se 10 mg de ácido ascórbico em 50 mL de ácido metafosfórico a 3%. Esta solução foi imediatamente utilizada para a padronização da solução de 2,6-diclorofenolindofenol devido à sua instabilidade.

Diluíram-se 5 mL da solução de ácido ascórbico (que contém 1 mg de ácido ascórbico) em 5 mL de ácido metafosfórico a 3%. Titulou-se com a solução de corante até obtenção de cor rósea estável durante 15 minutos.

Técnica

De modo a aferir a solução de 2,6-diclorofenol-indofenol com uma solução padrão de ácido ascórbico efectuou-se o seguinte procedimento:

- Transferiu-se 2 mL de solução padrão de ácido ascórbico (solução I) para um balão de 50 mL e completar o volume com solução de ácido metafosfórico.
- Transferiu-se a solução preparada para um *erlenmeyer* de 100 mL e titulou-se com solução de 2,6-diclorofenol-indofenol até ao aparecimento de uma coloração rósea estável pelo menos por 5 segundos.
- Realizou-se um ensaio em branco, titulando, para isso, 50 mL de solução de ácido metafosfórico.

Este procedimento foi realizado em triplicado e expressou-se a concentração da solução padrão de 2,6-diclorofenol-indofenol em termos de mg equivalentes de ácido ascórbico.

O doseamento de ácido ascórbico na amostra foi realizado da seguinte forma:

- Transferiu-se o volume equivalente a 2 mg de ácido ascórbico (5 mL) de amostra para um balão de 50 mL e completou-se o volume com solução de ácido metafosfórico.
- Titulou-se esta solução com solução de 2,6-diclorofenol-indofenol até aparecimento de uma coloração rósea estável pelo menos por 5 segundos.
- Realizou-se um ensaio em branco titulando, para isso, 50 mL de solução de

ácido metafosfórico.

O procedimento foi repetido 3 vezes e determinou-se a concentração de ácido ascórbico presente na amostra.

A determinação analítica do teor de ácido ascórbico foi baseada na titulação da amostra com uma solução corante padronizada de 2,6-diclorofenolindofenol.

3.4.4. Análise de carotenóides

Técnica

A absorvência da amostra foi determinada a um comprimento de onda de 450 nm [60] contra um branco de água destilada, utilizando um espectrofotómetro Hitachi U-2000. A absorvência foi determinada para as amostras de sumo aos tempos 0 horas (tempo zero de contacto com as resinas) e 6 horas (no final da reacção) de contacto com as resinas, e com as amostras das diferentes concentrações de sumo e mesma concentração de resinas.

3.5. Métodos experimentais

3.5.1. Preparação do sumo de laranja

Nos ensaios de adsorção da limonina foi utilizado sumo proveniente de laranjas Navel colhidas numa laranjeira de um pomar de localização geográfica a Sul de Portugal Continental.

Até à sua utilização, as laranjas foram conservadas a uma temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para obtenção do respectivo sumo, as laranjas foram espremidas manualmente num espremedor, sendo este de seguida centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos.

3.5.2. Parâmetros de validação do método de análise por HPLC

Com o objectivo de validar o método de análise, foi necessário verificar se o mesmo cumpria os requisitos mínimos necessários a uma análise quantitativa. A validação foi efectuada através do estudo de vários parâmetros e respectivo tratamento estatístico.

Estudo da linearidade e gama de trabalho

Foram utilizadas 10 soluções (replicados) preparadas de igual forma com concentrações correspondentes ao limite superior (10 ppm) e inferior (2 ppm) da gama de linearidade.

Foi determinado o tempo de retenção de cada padrão e calculado o seu desvio padrão relativo, ajustados os dados experimentais a uma função linear pelo método dos mínimos quadrados obtendo, assim, uma equação representativa da variação da resposta obtida (área), em função da concentração das várias soluções padrão, e o respectivo coeficiente de correlação linear. Foi efectuada a distribuição dos valores normalizados para cada nível de concentração, realizado o teste estatístico abordado pela norma ISO 8466-1 e ISO 8466-2 com o intuito de verificar a linearidade, calculado o coeficiente de variação do método e testada a homogeneidade de variâncias entre o limite inferior e o limite superior da gama de trabalho.

Determinação da repetibilidade do método

Foi avaliada a repetibilidade através do cálculo do desvio padrão relativo da resposta (área) obtida, pela análise de 10 soluções diferentes com a mesma concentração de padrão (replicados), sendo realizado o ensaio para 3 níveis de concentração [limite inferior da gama de trabalho (2 ppm), padrão intermédio (5 ppm) e limite superior da gama de trabalho (10 ppm)].

Determinação dos limiares analíticos

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados a partir do desvio padrão residual da curva de calibração e, também, a partir do desvio padrão das respostas obtidas após a injeção de

10 soluções padrão diferentes (2 ppm e 10 ppm), com a mesma concentração e preparadas de igual forma.

Estudo da precisão do método

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade, precisão intermédia e de homogeneidade de variâncias. Para o estudo da repetibilidade foram injectadas 10 soluções padrão correspondentes à concentração inferior (2 mg/L) e à concentração superior (10 mg/L) da gama de trabalho de cada composto.

Estudo da recuperação

As amostras foram fortificadas com concentrações de 4 mg/L, 6 mg/L e 8 mg/L de limonina em condições de repetibilidade. Calculou-se a quantidade de limonina nas amostras fortificadas e determinou-se a percentagem de recuperação, recorrendo à curva de calibração obtida no estudo da linearidade.

Exactidão

A avaliação deste parâmetro foi efectuada pelo cálculo da taxa de recuperação de amostras fortificadas ao longo da gama de trabalho.

3.5.3. Ensaio de adsorção da limonina

Para realizar, do ponto de vista industrial, a remoção de compostos amargos de produtos cítricos com recurso a resinas adsorventes, é necessário remover primeiro ou reduzir substancialmente o teor de polpa. Para tal, duas vias distintas podem ser seguidas: centrifugação ou ultra-filtração. Para a realização deste trabalho optou-se pela centrifugação dos sumos.

Do ponto de vista industrial, para remoção de compostos amargos de produtos cítricos com recurso a resinas adsorventes, é necessário remover primeiro ou reduzir substancialmente o teor de polpa. Para tal, duas vias

distintas podem ser seguidas: centrifugação ou ultra-filtração. Na realização deste trabalho optou-se por efectuar a centrifugação dos sumos.

3.5.3.1. Isotérmicas de adsorção da limonina para cada um dos adsorventes

Para o estabelecimento das isotérmicas q_e versus C_e , os dados experimentais foram obtidos através da variação da concentração de limonina.

Posteriormente à centrifugação, recolheu-se o sobrenadante que foi diluído nas proporções indicadas na tabela 3.4 abaixo, com água desionizada para obter um volume total de 10 mL para cada diluição. Deste volume foram retirados 2 mL e colocados em contacto com uma massa conhecida (20 mg por poço) de cada uma das resinas poliméricas em estudo (“Amberlite™” XAD™ 18, XAD™ 1600N e XAD™ 16N) em microplacas de 24 poços circulares de 3 mL de capacidade. Foram também utilizados dois poços que continham apenas sumo (2 mL) e resinas (20 mg). A reacção de adsorção ocorreu num agitador orbital a 170 rpm e a 30°C, durante 30 minutos, de modo a proporcionar as mesmas condições operacionais a todos os ensaios.. Após o tempo determinado, retiraram-se alíquotas da solução (livre de partículas de resina) com o auxílio de filtros de nylon para eppendorf. Posteriormente efectuaram-se diluições 1:2 (0,5 µL da amostra + 0,5 µL de água) e 1:5 (0,2 µL da amostra + 0,8 µL de água), para se proceder à análise por HPLC. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

Tabela 3.4. Esquema de diluições de amostras

9 mL sumo + 1 mL de água
9 mL sumo + 1 mL de água
8 mL sumo + 2 mL de água
8 mL sumo + 2 mL de água
7 mL sumo + 3 mL de água
7 mL sumo + 3 mL de água
6 mL sumo + 4 mL de água
6 mL sumo + 4 mL de água
5 mL sumo + 5 mL de água
5 mL sumo + 5 mL de água

O ajuste dos modelos de Freundlich (Eq. 11) e Langmuir (Eq. 12) aos dados experimentais foi realizado recorrendo a um programa de ajuste não linear do Excel (*Windows XP, Microsoft, USA*), através da minimização da soma dos quadrados dos resíduos entre os dados experimentais e os valores estimados pelo modelo. Para tal, recorreu-se à função *solver* do Excel (*Windows XP, Microsoft, USA*).

3.5.3.2. Efeito do tempo de contacto

Para diferentes copos pesaram-se 0,3 g de adsorvente, resinas neutras “AmberliteTM” XAD18, XAD1600N e XAD16N, aos quais foram adicionados 30 mL de sumo centrifugado. A adsorção ocorreu num agitador orbital a 170 rpm e os ensaios foram realizados a uma temperatura constante de 30 °C. Foram recolhidas amostras ao tempo 0 minutos (t_0), depois de 10 em 10 minutos até 1 hora e depois ainda de 60 em 60 minutos até aos 360 minutos. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

Cada amostra, retirada para tubos *ependorf*, sofreu uma diluição de 1:1, perfazendo um volume total de 2 mL.

A limonina presente no sumo foi determinada por HPLC, em todos os

tempos do ensaio, com filtração prévia da amostra por filtro de membrana com porosidade de 0,45 μm .

3.5.3.3. Efeito da concentração de adsorvente

De forma a identificar a concentração óptima de adsorvente, colocaram-se em contacto, isoladamente em microplaca, diferentes quantidades de “Amberlite™” XAD18 e XAD1600N, num intervalo de concentrações de 5 a 25 g/L (0,5 % a 2,5 %), com 2 mL de sumo de laranja, previamente centrifugado. A adsorção foi levada a cabo a uma temperatura constante de 25 °C, no agitador orbital a 140 rpm durante 60 minutos.

3.5.4. Ciclodextrinas

Em dois balões volumétricos foram colocadas 24 mg de γ -ciclodextrina e 21 mg β -ciclodextrina, respectivamente, e depois dissolvidas em 250 mL de água, para obtenção de soluções-mãe de ambas as ciclodextrinas na concentração de 0,015 mM.

Posteriormente, foram colocados 1 mL de sumo em microplacas de 24 poços circulares, juntamente com 1 mL de diferentes concentrações de ciclodextrina, diluindo a solução-mãe anteriormente preparada nas proporções de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. Em dois poços foi colocada uma diluição de sumo em água na proporção de 1:1 (1 mL sumo + 1 mL água), para se verificar a quantidade de limonina presente no sumo.

A microplaca foi depois colocada num agitador orbital a 170 rpm e a 30 °C, durante 24 horas, de modo a proporcionar as mesmas condições operacionais a todos os ensaios. Após as 24 horas, retiraram-se alíquotas da solução, filtrando-as com o auxílio de filtros de nylon para *ependorf*. Posteriormente efectuaram-se diluições 1:8, para se proceder à análise por HPLC. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

3.5.5. Ensaio bioactividade

3.5.5.1. Animais

Na realização do trabalho experimental seleccionaram-se ratos Wistar macho (n=70 para os ensaios com o sumo processado com resina e n=42 para os ensaios com o sumo processado com ciclodextrina), originários da Harlan Ibérica (Barcelona, Espanha), com o peso compreendido entre 100 e 150 g, sujeitos a ciclos diários de 14 h e a uma temperatura de 25 °C no biotério de manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Os animais foram alimentados com uma dieta de manutenção IPM-R20 (Letica) e água *ad libitum* até às 24 horas anteriores à data da experiência, momento a partir do qual se suspendeu a dieta e se manteve livre acesso à água.

O manuseamento dos animais decorreu de acordo com a *Guidance in the Operation of Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, publicada por *Her Majesty's Stationary Office* (Reino Unido) e com as regulamentações da União Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986).

3.5.5.2. Preparação de soluções

A solução de λ -carragénio (carragenina) a 1 % foi preparada por dissolução de 0,1 g de λ -carragénio em soro fisiológico, num balão volumétrico de 10 mL, com ajuda de ultrasons.

A solução de Triton x-100 a 0,15 % (v/v) em NaCl 0,1 % (p/v), para utilização no pletismómetro foi preparada após pesagem de 10 g de cloreto de sódio e dissolução em água destilada num balão de 1 L, perfez-se o volume com o mesmo solvente. Em seguida transferiram-se 150 mL de Triton X-100 para um balão volumétrico de 1 L e perfez-se o volume com solução de NaCl a 0,1 % (p/v).

A solução de indometacina (10 mg / kg de animal) foi preparada num balão de 100 mL por dissolução de 25 mg de indometacina em soro fisiológico e perfez-se o volume com o mesmo solvente.

3.5.5.3. Métodos

Para a avaliação da contribuição das propriedades de uma determinada substância num possível efeito anti-inflamatório, pode utilizar-se o modelo experimental de edema da pata usado frequentemente na avaliação das propriedades anti-inflamatórias de fármacos. Este consiste em avaliar a capacidade da substância a testar na inibição do edema da pata do rato provocado pela injeção de uma substância irritante.

Entre as substâncias irritantes mais utilizadas destaca-se o formaldeído, o dextrano, a albumina do ovo, o Aerosil® e o λ -carragénio (carragenina).

Para a avaliação do efeito provocado recorre-se na maioria dos casos à medição do volume da pata do animal.

3.5.5.4. Procedimento experimental

O procedimento foi efectuado com base no modelo experimental do edema da pata, utilizado para avaliar o efeito de compostos com possível actividade anti-inflamatória descrito por Vogel e Vogel [61].

O estudo foi efectuado em seis grupos de animais para cada um dos tipos de sumo processado - sumo processado com resina e sumo processado com ciclodextrina.

Os animais foram identificados, pesados e divididos aleatoriamente, de acordo com as Tabelas 3.5 e 3.6.

Utilizaram-se ratos macho com um peso compreendido entre 100 e 150 g e administrou-se através de uma sonda gástrica, 5 mL da solução em estudo ou soluções controlo.

Tabela 3.5. Grupos de animais para ensaios com sumo processado com resina XAD-18

Grupo	Administração oral	Dose (mg/kg)	Administração intraplantar (carragenina)	Volume de administração intraplantar (ml)
Controlo (n=7)	Veículo	-	Soro fisiológico	0.1
Carragenina (n=7)	Veículo	-	Carragenina 1%	0.1
Sumo não processado t_0 (n=7)	Sumo	??	Carragenina 1%	0.1
Sumo + resina t_f (n=7)	Sumo + ciclodextrina	??	Carragenina 1%	0.1
Limonina (n=7)	Limonina + ciclodextrina	??	Carragenina 1%	0.1
Indometacina (n=7)	Indometacina	10	Carragenina 1%	0.1

Tabela 3.6. Grupos de animais para ensaios com sumo processado com β -ciclodextrina

Grupo	Administração oral	Dose (mg/kg)	Administração intraplantar (carragenina)	Volume de administração intraplantar (ml)
Controlo (n=4)	Veículo	-	Soro fisiológico	0.1
Carragenina (n=8)	Veículo	-	Carragenina 1%	0.1
Sumo (n=8)	Sumo	??	Carragenina 1%	0.1
Sumo + ciclodextrina (n=8)	Sumo + ciclodextrina	??	Carragenina 1%	0.1
Limonina + ciclodextrina (n=8)	Limonina + ciclodextrina	??	Carragenina 1%	0.1
Indometacina (n=6)	Indometacina	10	Carragenina 1%	0.1

Aos grupos Controlos apenas se administrou soro fisiológico por via intraplantar, não tendo sido sujeitos à indução da formação de edema pela carragenina. Aos restantes grupos foi induzido edema na pata esquerda através da administração intraplantar de 0.1 ml de uma dispersão a 1% de λ -carragenina em soro fisiológico. O grupo Carragenina não foi tratado com nenhum fármaco, tendo apenas sido administrado veículo pela via *p.o.*, servindo de controlo do edema produzido pela carragenina.

Os controlos positivos foram obtidos com os grupos de animais tratados com indometacina (Indom.).

A solução limonina apresentava a uma concentração igual à existente no sumo antes do processamento.

Em cada animal marcou-se com tinta (resistente à água) a articulação da pata esquerda de cada rato (ao nível do maléolo, eminência óssea do tornozelo) procedendo-se em seguida à medição do volume da pata. Os fármacos foram administrados de seguida por via oral (sonda gástrica). Após este procedimento, a carragenina foi administrada por via intraplantar na pata esquerda de cada rato (exceptuando os do grupo Controlo). Ao momento de administração de carragenina atribuiu-se o tempo zero ($t=0h$), procedendo-se imediatamente à medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 3 horas e 6 horas após a administração da carragenina ($t=3h$ e $t=6h$). O volume medido antes de qualquer administração foi designado por V , o volume medido ao tempo zero é designado por V_0 e o volume medido às 6 horas é designado por V_6 .

Todas as medições do volume da pata foram efectuadas num pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica Scientific Instruments). A pata é imersa numa solução detergente [solução de Triton X-100 a 0.15% (v/v) e cloreto de sódio 0.1% (m/v)] contida num vaso pertencente a um sistema de dois vasos comunicantes. Ao imergir a pata fez-se coincidir a marcação desta com a marcação existente no vaso. A variação do volume por imersão da pata é indicada directamente pelo aparelho.



Figura 3.4. Medição do volume da pata do rato no pletismómetro

4. Resultados e Discussão

4.1. Validação do método de HPLC para análise da limonina

Neste trabalho adoptou-se o método HPLC-UV para determinação da limonina em sumos de citrinos, dada a sua sensibilidade, rapidez e resolução [18, 57].

As condições cromatográficas, HPLC, utilizadas na determinação do teor de limonina em sumo de laranja foram as descritas em estudos anteriores [29], utilizando-se uma coluna de fase reversa RP-18, um sistema de fase móvel isocrático, com um eluente de acetonitrilo/água (45 % / 55 %), a um fluxo constante de 1 mL/min, um comprimento de onda de 210 nm, tendo sido utilizados em cada corrida, padrões externos de limonina.

A validação do método iniciou-se após um período inicial de familiarização com o método HPLC-UV, em que se adquiriram os conhecimentos sobre as condições de manuseamento e armazenamento das amostras, preparação de reagentes e realização dos ensaios.

4.1.1. Linearidade e gama de trabalho

Para determinar o intervalo de concentrações no qual a resposta do detector é linear, foram preparadas 10 soluções de limonina com concentrações entre 1 e 10 mg/L, as quais foram analisadas por HPLC-UV. A determinação do intervalo de linearidade do método foi estabelecido com base no coeficiente de determinação e no seu coeficiente de variação, na determinação dos valores normalizados, nos resultados do teste de Fisher-Snedecor e no teste de RIKILT.

A tabela 4.1 apresenta os resultados iniciais dos testes aplicados para a avaliação da linearidade do método. Estes valores representam a gama total de concentrações analisada.

Tabela 4.1. Parâmetros da curva de calibração da limonina por HPLC-UV e respectivos limiares analíticos.

	N	10
	Gama de Concentrações (mg/L)	1 - 10
	R	0,9988
	R ²	0,9976
	b	38754,919
	a	1711,22
	CV _m (%)	2,9
	Análise de Resíduos (%)	[-8,3; 6,7]
	Áreas Normalizadas (%)	[99; 112]
	RIKILT (%)	[95; 107]
Mandel	F (1, N-3, 95%)	5,59
	VT	0,22
	LOD (mg/L)	0,48
	LOQ (mg/L)	1,59

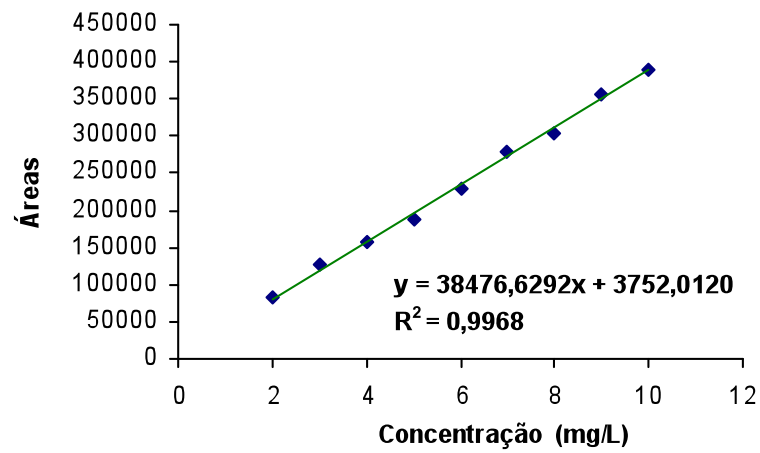
Legenda:

N - nº de pontos de calibração; R – coeficiente de correlação; R² - coeficiente de determinação; b – declive; a – ordenada na origem; CV_m(%) – coeficiente de variação do método; VT – valor-teste de Fisher Snedecor; F – valor tabelado de Fisher Snedecor, para um grau de confiança de 95%; LOD = 3 × S_{x/y}/b; LOQ = 10 × S_{x/y}/b).

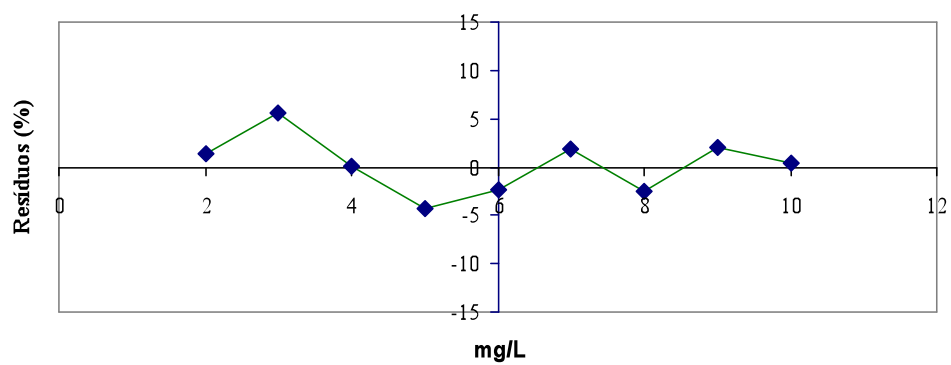
O método apresentou uma boa correlação entre o sinal instrumental e a variação da concentração da limonina com um coeficiente de determinação superior a 0,995 e um coeficiente de variação inferior a 5%. A análise de resíduos e o teste dos valores normalizados apresentaram desvios inferiores a 15% e o teste de RIKILT obedeceu ao critério de aceitação de 10%. Como o valor de teste (VT) foi menor que o valor tabelado de F Snedecor/Fisher para n-1 graus de liberdade e uma probabilidade de 95 %, então a função de calibração linear conduziu a um bom ajuste dos pontos experimentais.

No entanto, o limite de quantificação do método (LQ = 1,59 mg/L) foi superior ao primeiro ponto da curva de calibração (1 mg/L), indicando que o primeiro nível de concentração do intervalo de linearidade deve ser superior. Deste modo, eliminou-se o ponto correspondente à concentração de 1 mg/L e reformulou-se os testes de linearidade.

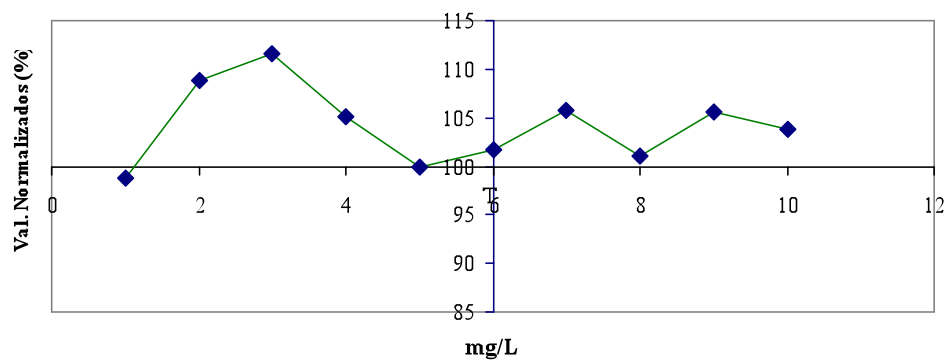
A figura 4.1 apresenta os resultados dos estudos de linearidade da limonina na gama de concentrações de 2 – 10 mg/L.



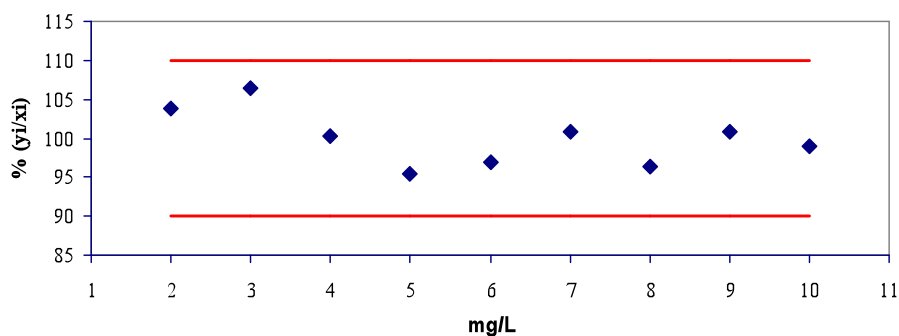
a. Curva de Calibração



b. Análise de resíduos [-8,3; 6,7]



c. Teste das áreas normalizadas [99; 112]



d. Teste de RIKILT [95; 107]

$$VT = 1,44$$

$$F_{(1; 6; 95\%)} = 5,99$$

Figura 4.1. Testes estatísticos para estudo da linearidade. Curva de Calibração (a), análise de resíduos (b), teste das áreas normalizadas (c) e teste RIKILT (d).

O método permitiu obter um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9968$), um excelente coeficiente de variação do método ($CV_m = 2,8\%$) e foi linear na gama de concentrações estudada ($VT < F_{(1; N-3; 95\%)}$).

A análise de resíduos e o teste das áreas normalizadas apresentaram uma variação inferior a 15%, valor máximo considerado como aceitável e o teste de RIKILT cumpre o requisito dos 10%.

O limite de quantificação calculado a partir da recta de calibração foi inferior (1,7 mg/L) ao primeiro ponto do intervalo de linearidade (2 mg/L).

Após determinação do intervalo de linearidade procedeu-se ao teste de homogeneidade de variâncias, analisando 10 réplicas independentes dos dois níveis de concentração extremos do intervalo de linearidade, 2 e 10 mg/L de limonina. O valor teste (3,51) foi inferior ao valor tabelado de Fisher-Snedecor ($F_{(9;9;99\%)} = 5,35$) indicando que a gama de trabalho está bem ajustada.

De acordo com a norma ISO 8466-1 [52], quando não é efectuada a curva de calibração sempre que se analisa uma série de amostras, o laboratório deve definir um processo para verificação da validade da curva usada, face a critérios de aceitação de desvios. Neste trabalho optou-se pela

verificação da curva de calibração, nos ensaios realizados nos diferentes dias, através da análise de três padrões de diferentes concentrações.

4.1.2. Limites analíticos

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) da limonina por HPLC-UV determinado em condições de repetibilidade foi de 0,42 e 1,4 mg/L, respectivamente.

O limite de quantificação determinado nestas condições foi semelhante ao determinado com base na recta de calibração (Figura 4.1, a) e obedece ao requisito de ser inferior ou igual ao primeiro nível de concentração da gama de trabalho.

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) determinaram-se com base na curva de calibração e em condições de repetibilidade.

4.1.3. Precisão

A precisão do método cromatográfico foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Ensaios de precisão do método de HPLC-UV para a determinação da limonina.

Concentração limonina (mg/L)	Repetibilidade n=10	Precisão intermédia N=10, 3 dias
		DPR (%)
2	8,2	9,9
10	2,5	1,3

Os valores de DPR (%) variaram entre 2,5 - 8,2 % e 1,3 – 9,9 % para a repetibilidade e para a precisão intermédia respectivamente.

O limite da repetibilidade, r , foi de 0,393 e 0,737, para as concentrações de 2 e 10 mg/L de limonina, respectivamente. A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i , X_{i-1}), em condições de repetibilidade variou entre 0,035 e 0,35 para a concentração de 2 mg/L e entre 0,038 e 0,529 para a concentração de 10 mg/L.

Em função dos resultados obtidos, podemos concluir o método cromatográfico é um método preciso.

4.1.4. Recuperação

Para estudar o efeito de matriz analisaram-se amostras de sumo fortificadas com concentrações de 4 mg/L, 6 mg/L e 8 mg/L de limonina em condições de repetibilidade.

Para estudar o efeito de matriz analisaram-se amostras de sumo de laranja fortificadas com concentrações de 4 mg/L, 6 mg/L e 8 mg/L de limonina em condições de repetibilidade (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Ensaio de recuperação da limonina em sumo de laranja (n=3)

Fortificação limonina (mg/L)	Recuperação, %	DPR (%)
4	114	6,0
6	116	1,7
8	111	1,2

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a recuperação não é afectada na gama de concentrações estudada, obtendo-se valores de recuperação entre 111 e 116 % e com um desvio padrão entre 1,2 e 6,0%. Deste modo, o efeito de matriz não afecta o doseamento da limonina nos sumos de laranja.

4.1.5. Análise de amostras de sumos

O método anteriormente descrito foi aplicado à análise das várias

amostras de sumos de citrinos de forma a identificar e quantificar a limonina.

Entre as amostras foram analisados sumos de laranja (laranjas com origem numa laranjeira de um pomar do sul do Alentejo e laranjas adquiridas num supermercado), de toranja, sumo de lima natural, de tangerina, de limão, todas espremidas *in situ*. A identificação da limonina foi realizada por comparação com o tempo de retenção duma solução padrão.

No que diz respeito à análise comparativa da limonina em sumos de diferentes citrinos apresentam-se os resultados na tabela 4.5.

Nas amostras de sumo de laranja e de tangerina (ambas adquiridas no supermercado), não foi detectada a presença de limonina.

Tabela 4.4. Análise de limonina em sumos de citrinos

Sumos	Ano	Limonina Conc. (mg/L)	Desvio padrão RSD (%)
Laranjas do Alentejo (uma laranjeira)	2010 n=5	27,18	1,99
	2009 n=3	10,63	13,73
	2008 n=3	10,92	24,79
Laranja do Alentejo (de outras laranjeiras)	2009 n=3	n.d.	-
Laranja (supermercado)	2010 n=3	n.d.	-
Limão	2010 n=3	12,62	1,75
Tangerina	2010 n=3	n.d.	-
Toranja	2010 n=3	11,08	0,42
Lima	2010 n=3	14,06	0,19

n.d. – não detectado

Da comparação dos vários sumos verifica-se que as laranjas com origem numa laranjeira de um pomar alentejano e utilizadas neste trabalho são as que, em média, apresentam uma concentração muito superior de limonina.

A quantidade de limonina encontrada nos vários sumos, está de acordo com os valores publicados por outros autores, sendo geralmente inferior a 20 mg/L [10, 62, 63], com excepção das laranjas do ano de 2010 em que a concentração de limonina é consideravelmente mais elevada. Abbasi et al. [62] obtiveram valores entre 21,39 mg/L e 14,35 mg/L, para o sumo da laranja iraniana, enquanto Breksa e Ibarra [63] registaram valores entre 13,1 mg/L e 1,8 mg/L para sumo de diferentes citrinos.

4.2. Supressão da limonina de sumos de laranja

Com o presente estudo pretendeu-se desenvolver um método de supressão de limonina, composto amargo em sumos, em alternativa ou em complementaridade à bioconversão desses compostos e que alterasse o menos possível as características dos sumos citrinos.

Para que este objectivo fosse atingido, utilizaram-se duas técnicas: a adsorção a resinas sintéticas neutras (Amberlite™ XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18) e a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (γ -ciclodextrina e β -ciclodextrina).

4.2.1. Adsorção a resinas neutras

Uma vez que a adsorção é um fenómeno de superfície, é importante que os adsorventes proporcionem uma grande área superficial externa e interna associada à sua estrutura porosa. A capacidade de adsorção depende, portanto, do tipo e tamanho dos poros, bem como da sua distribuição, e da natureza da superfície do adsorvente.

A partir dos valores estimados da concentração da limonina adsorvida foi possível comparar a capacidade de adsorção de cada um dos adsorventes (resinas XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18) utilizados. Para esse efeito, utilizou-se o termo, q_e , que representa a massa de soluto adsorvido por massa de adsorvente, no equilíbrio:

$$q_e = (C_i - C_f) v / M \quad (\text{eq. 14})$$

onde:

C_i – concentração inicial do soluto (mg/L)

C_f – concentração final do soluto (mg/L)

v – volume de sumo (L)

M – massa de adsorvente (mg)

Os ensaios de adsorção tiveram como objectivo seleccionar os melhores adsorventes para a remoção da limonina do sumo de laranja, ao pH do sumo ($\approx 3,5$), sem alteração considerável dos outros compostos do sumo, nomeadamente os açúcares, os carotenos e a vitamina C.

4.2.1.1. Influência do tempo de contacto

Nos estudos de adsorção, o tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio entre a solução e o adsorvente a utilizar, é um parâmetro importante. A determinação do tempo de contacto que origina a máxima adsorção é muito importante na indústria alimentar, que tem como um dos objectivos minimizar os custos mantendo um elevado nível de produção.

Para encontrar o tempo de contacto óptimo, ou seja o que origina a máxima eficiência (razão entre a concentração de limonina adsorvida e a concentração de limonina presente no sumo antes da adsorção), é fundamental a determinação da velocidade de adsorção. As cinéticas foram determinadas pelo contacto dos adsorventes (resinas AmberliteTM XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18) com o sumo de laranja.

A figura 4.2 apresenta a curva de adsorção de limonina obtida para cada um dos adsorventes testados. Verifica-se que o equilíbrio de adsorção foi obtido aproximadamente ao fim de 120 minutos, para as três resinas XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18. Pode verificar-se também que mais de 80 % de limonina é adsorvida pela resina XAD-18, no mesmo intervalo de tempo (120 min), em comparação com os 45 % adsorvidos pela XAD-16N e os 25 % pela XAD-1600N.

Este é um aspecto muito importante na indústria dos sumos de laranja, pois a utilização de curtos períodos de tempo evitam os fenómenos de degradação dos sumos, e mostram igualmente que podem ser implementados processos em contínuo.

O modelo descrito pela seguinte equação:

$$dC_t/dt = -k_1(1-q)/q_{\max} \cdot C_t \quad (\text{eq. 15})$$

foi ajustado aos dados experimentais descrevendo a cinética de adsorção da limonina nos vários adsorventes. Neste modelo C_t é a concentração de limonina no sumo no instante t ; q é a concentração de limonina adsorvida no instante t , q_{\max} é a capacidade máxima do adsorvente; e k_1 é uma constante de adsorção. Este modelo assume que a adsorção é proporcional à concentração de limonina na fase líquida e à fracção de superfície de adsorvente não ocupada.

Os parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 4.6. De acordo com este modelo a capacidade máxima de adsorção (q_{\max}) a 30°C, foi muito superior na resina XAD-18 (3,25 mg/g) à observada para as resinas XAD-16N (1,18 mg/g) e XAD-1600N (1,19 mg/g).

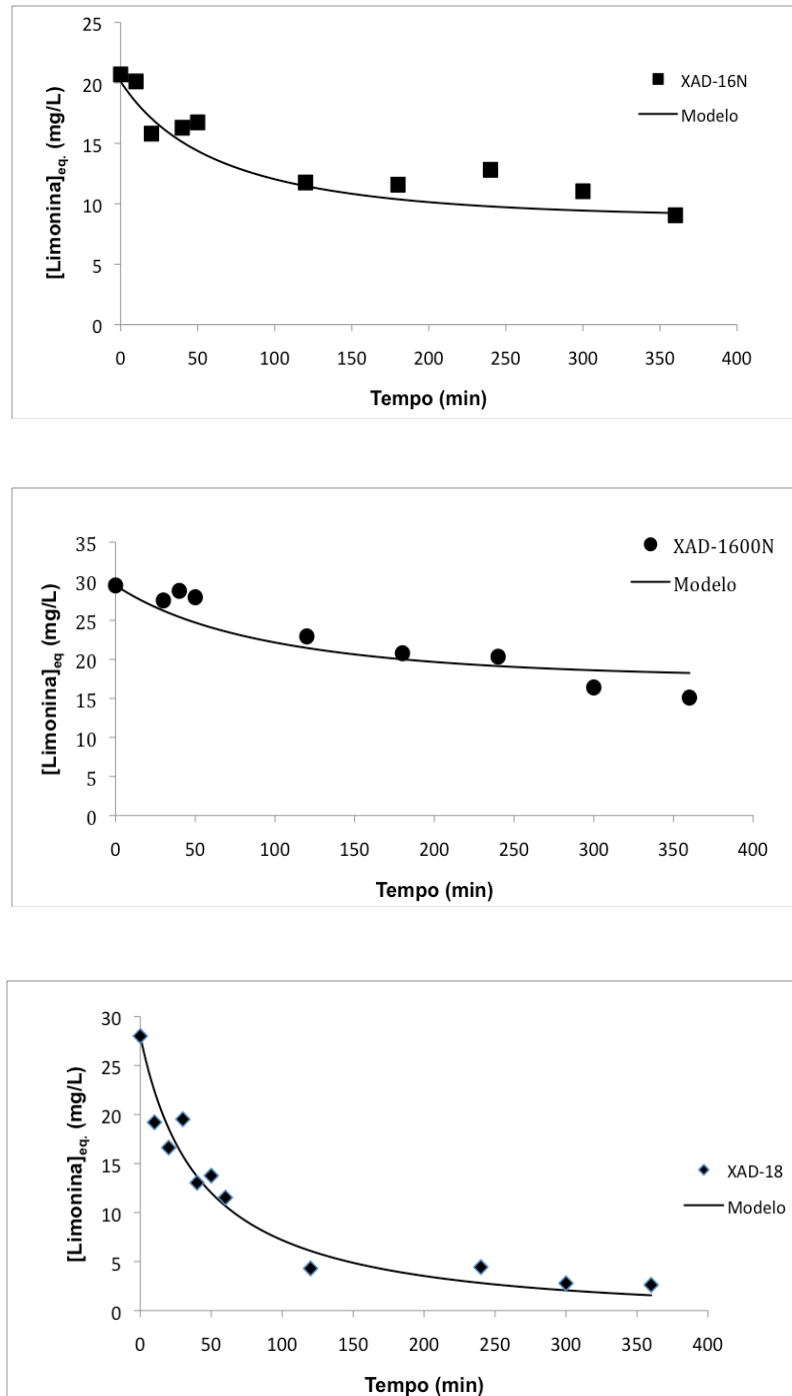


Figura 4.2. Representação gráfica da concentração de limonina vs. tempo de contacto para cada uma das resinas utilizadas.

Tabela 4.5. Pârametros estimados para o modelo da adsorção da limonina em função do tempo

Adsorvente	k_1 (min^{-1})	q_{max} (mg/g)
XAD-16N	0,010	1,18
XAD-1600N	0,005	1,19
XAD-18	0,024	3,25

De modo a avaliar o efeito da difusão intraparticular da limonina nas resinas, foi representado graficamente q (limonina adsorvida por massa de adsorvente) versus $t^{1/2}$ (Fig. 4.3.).

Em materiais porosos, existe uma relação empírica entre o soluto adsorvido e a raiz quadrada do tempo de contacto, até se atingir o equilíbrio. Podem ser ajustados três tipos de curvas, representativas da presença de limitações difusionais [64].

Neste estudo, observou-se uma evolução semelhante para as resinas XAD-16N e XAD-18, com curvas do tipo I, o que significa que existe um período de indução inicial causado por uma barreira física à superfície do adsorvente. Estes resultados indicam assim a existência de limitações difusionais, apesar de os ensaios terem sido conduzidos com agitação. A resina XAD-1600N apresenta um período de indução inicial superior ao das resinas referidas anteriormente.

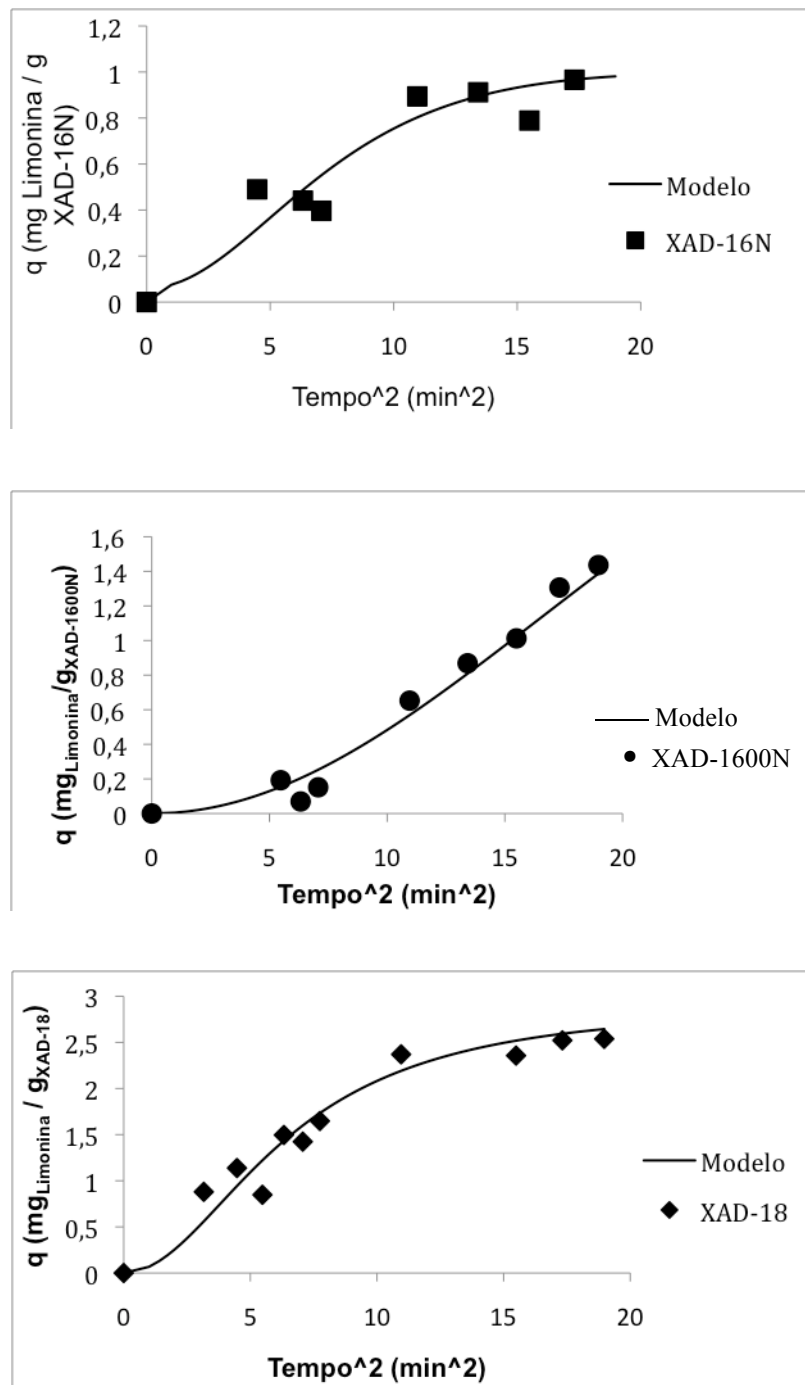


Figura 4.3. Eficiência da adsorção da limonina em função do $t^{1/2}$, a 30°C, nas resinas: XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18.

Num estudo efectuado por Shaw *et al.* [30] as resinas XAD-4 e XAD-16 removeram aproximadamente 50 % dos componentes amargos dos sumos de citrinos.

4.2.1.2. Efeito da concentração de resinas

A limonina adsorvida nas resinas XAD-1600N e XAD-18 foi avaliada após um tempo de contacto de 60 minutos. A eficiência de adsorção, representada por q_e (Equação 6) em função da concentração de resina, está apresentada na Fig 4.4.

Os melhores resultados foram obtidos para a resina XAD-18 com valores de adsorção superiores a 80 %. Pode ainda inferir-se que a adsorção é favorecida com uma concentração de adsorvente próxima de 5 g/L para as duas resinas testadas, pois as eficiências de adsorção são comparativamente bastante elevadas.

Observa-se uma diminuição da eficiência de adsorção com o aumento da massa de adsorvente, de acordo com equações exponenciais para as resinas XAD-1600N e XAD-18. Tal facto deve-se a uma elevada adsorção de limonina mesmo com baixas concentrações de adsorvente. Ribeiro *et al* [29] obtiveram elevadas eficiências de adsorção, para as resinas XAD-16, XAD-7 e carvão activado, superiores a 95% (m/v), com baixa quantidade de adsorvente (menos de 1%, m/v), para um tempo de contacto de 2 horas.

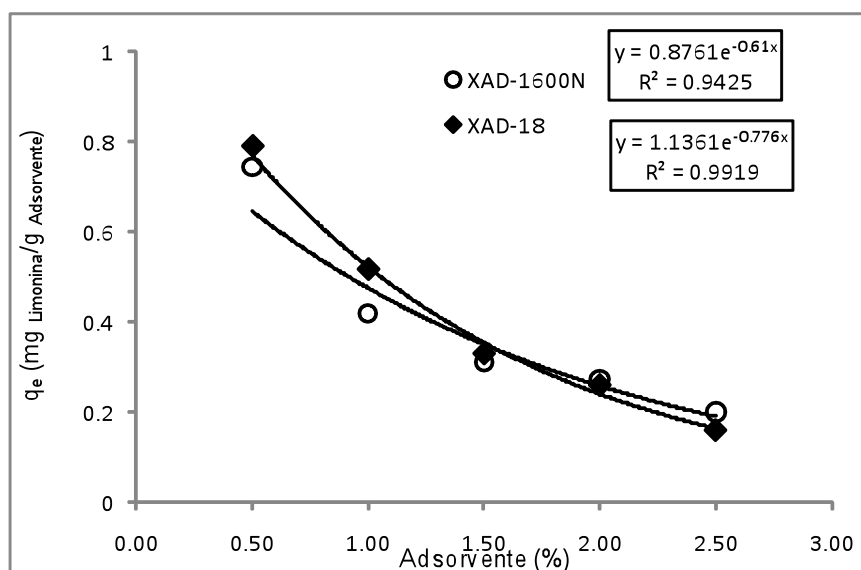


Figura 4.4. Eficiência de adsorção de limonina em função da concentração de adsorvente, após 60 min (♦XAD-18; O XAD-1600N).

4.2.1.3. Isotérmicas de adsorção

Para além do estudo da adsorção da limonina, presente no sumo de laranja, a diferentes adsorventes e em diferentes concentrações, avaliou-se igualmente, a adsorção de açúcares redutores, carotenos e vitamina C.

Limonina

Os modelos de Freundlich e Langmuir foram ajustados aos dados experimentais obtidos na adsorção de várias concentrações de limonina (*c.f.* 3.5.2.2) em sumo de laranja a uma concentração fixa de adsorvente, a 30 °C, durante 60 minutos (Fig. 4.5).

Os parâmetros estimados por regressão não linear das respectivas equações encontram-se indicados na Tabela 4.7.

O parâmetro n do modelo de Freundlich é inferior a 1 para as três resinas, XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18, o que indica que o processo de adsorção da limonina é favorável em todas.

O parâmetro q_{\max} do modelo de Langmuir apresenta o valor mais elevado para a resina XAD-18. Os valores de R_L (Equação 3), incorporados na Tabela 4.7. encontram-se entre 0 e 1 para as três resinas, reforçando novamente que o processo de adsorção é favorável.

Ribeiro *et al* [29] observaram consideráveis desvios aos modelos de Langmuir e Freundlich quando foram utilizados terras de diatomáceas e carvão activado granulado como adsorventes da limonina de sumos de laranja, tendo as isotérmicas para estes exibido um perfil sigmóide. Neste mesmo estudo, uma avaliação comparativa entre a capacidade adsorvente de resinas neutras sintéticas (Amberlite™ XAD-4, XAD-7 e XAD 16), permitiu verificar um ajuste favorável dos modelos de isotérmicas de Langmuir e Freundlich para a adsorção de limonina em todas as resinas utilizadas, tendo a resina XAD-7 demonstrado a maior eficiência de adsorção.

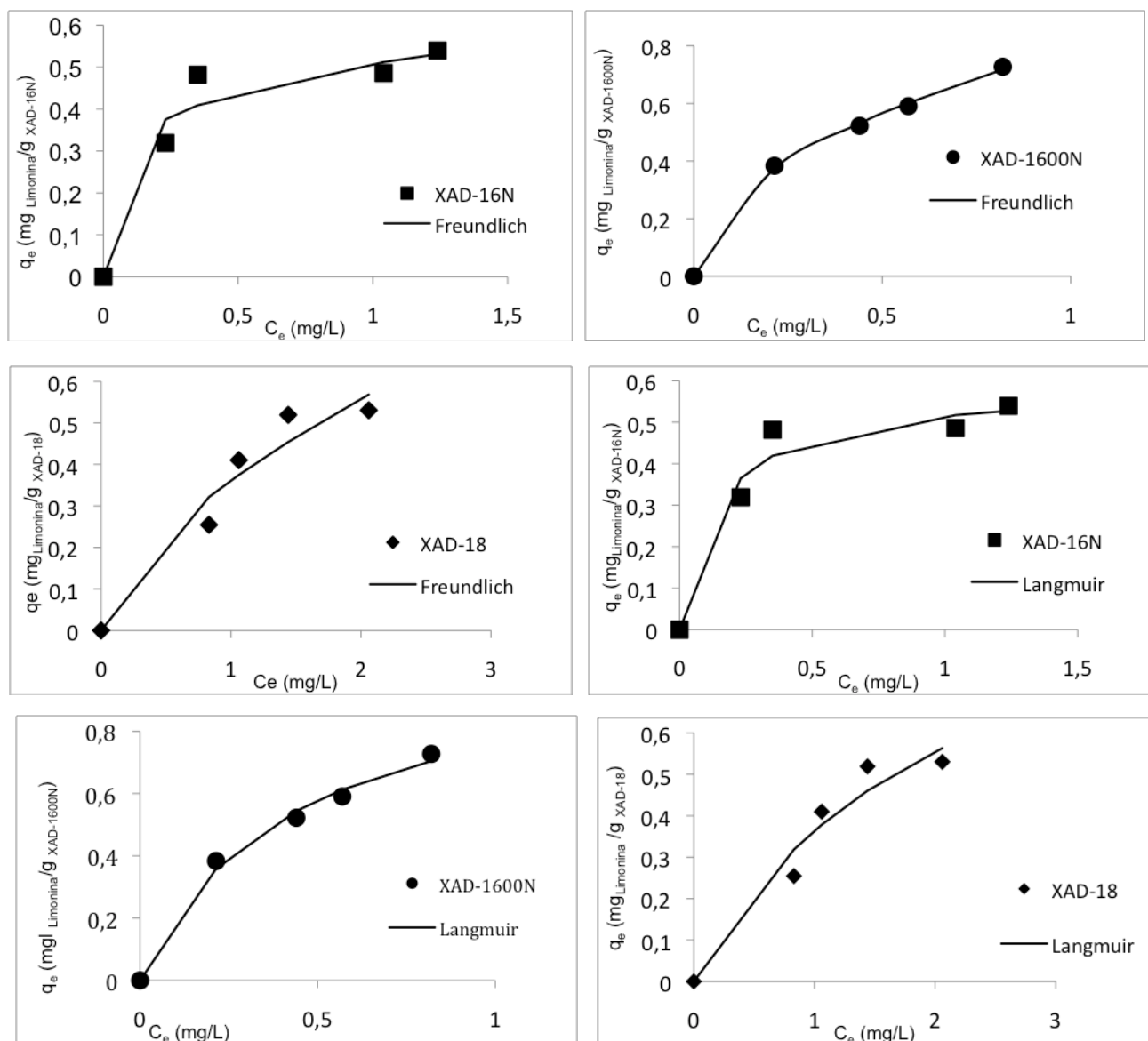


Figura 4.5. Isotérmicas de adsorção (modelos de Freundlich e Langmuir) de limonina para as 3 resinas: XAD-18, XAD-16N e XAD-1600N

Açúcares redutores

Os modelos de Freundlich e Langmuir foram ajustados aos dados experimentais obtidos na adsorção de várias concentrações de açúcares redutores (Fig. 4.5), de acordo com a tabela de diluições 3.4. (c.f. 3.5.2.2).

Os parâmetros estimados por regressão não linear das respectivas equações encontram-se indicados na Tabela 4.6.

Para a resina XAD-18 verifica-se uma adsorção não favorável, caracterizada por uma curva concava e um valor do parâmetro n do modelo de Freundlich superior à unidade.

Para as resinas XAD-16N e XAD-1600N o valor de n é inferior à unidade, sendo que no segundo caso para além de um n inferior o valor de k_f é superior, o que significa que a adsorção dos açúcares redutores do sumo de laranja é superior na resina XAD-1600N. Contudo para a resina XAD-16N o valor de q_{\max} dos açúcares redutores é bastante superior ao obtido com a XAD-1600N.

Face a estes resultados de, adsorção de açúcares redutores, e aos obtidos na adsorção da limonina podemos concluir que a resina XAD-18 é a mais indicada para processamento do sumo quando comparada as XAD-16N e XAD-1600N.

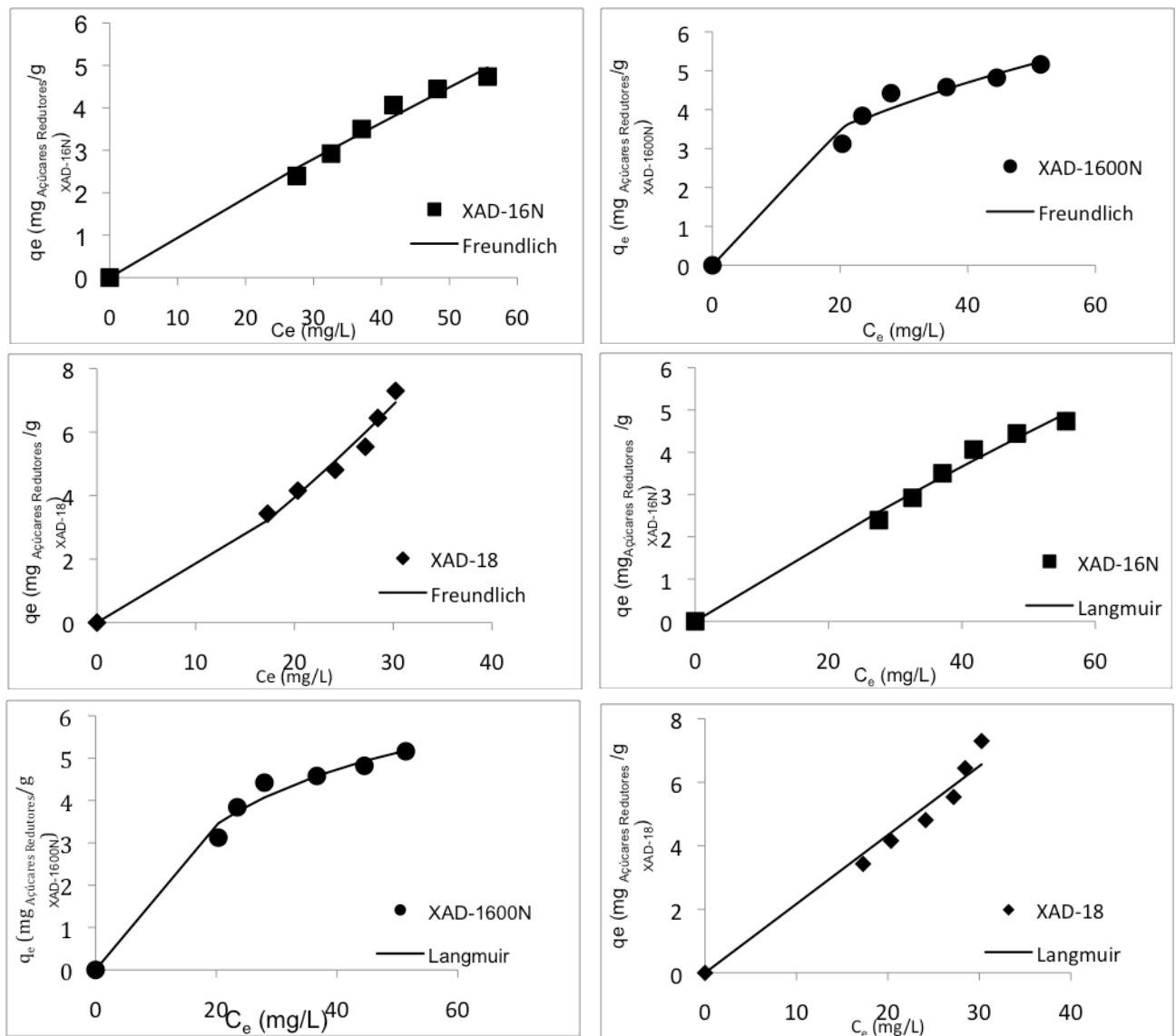


Figura 4.6. Isotérmicas de adsorção de açúcares redutores (modelos de Freundlich e Langmuir) de limonina para as 3 resinas: XAD-18, XAD-16N e XAD-1600N

Tabela 4.6. Pârametros estimados para os modelos das isotérmicas de Freundlich e Langmuir para a adsorção da limonina e açúcares redutores

Composto	Adsorvente	Modelo de Freundlich		Modelo de Langmuir		
		$q_e = k_f C_e^{-n}$		$q_e = q_{\max} \cdot C_e / (K_L + C_e)$		$R_L = 1 / (1 + K_L^{-1} \cdot C_e)$
		k_f	n	q_{\max} (mg/g)	K_L (mg/L)	R_L
Limonina	XAD-16N	0,51	0,21	0,59	0,14	0,29
	XAD-1600N	0,79	0,49	1,07	0,42	0,43
	XAD-18	0,36	0,63	1,17	2,21	0,61
Açúcares Redutores	XAD-16N	0,12	0,92	41,40	412,37	0,90
	XAD-1600N	0,97	0,43	7,67	24,76	0,40
	XAD-18	0,07	1,37	-	-	-

Carotenos e Vitamina C

Nas amostras anteriores avaliou-se igualmente a percentagem de carotenos e de vitamina C antes e após adsorção. Verificou-se que para as três resinas testadas não houve alteração do teor de carotenos, nem de vitamina C, presentes no sumo de laranja. Foi obtido um resultado semelhante quando se testou o efeito do tempo na adsorção dos carotenos e da vitamina C, às diferentes resinas.

Segundo o estudo efectuado por Shaw *et al.* [65], utilizando XAD-4 e XAD-16, não foram encontradas diferenças no teor de ácido ascórbico nem na coloração do sumo entre os sumos obtidos do processamento com resinas e o sumo inicial. Contudo, não foi feita uma avaliação sensorial desses sumos [65].

Foram levados a cabo vários estudos [29, 66, 67] sobre a actividade de resinas neutras como adsorventes de limonóides e flavonóides em produtos cítricos, tendo demonstrado que os sumos tratados por este processo perdem o sabor amargo excessivo, mantendo as suas características e melhorando a sua qualidade total. Os parâmetros físicos e químicos mantêm-se substancialmente inalterados, exceptuando o teor de limonina, naringina, hesperidina e outros flavonóides. Foram também processados com resinas adsorventes, outros sumos, com por exemplo o de

bergamota e o de laranja amarga. Neste caso, o sabor pode ser melhorado reduzindo a acidez por intermédio da utilização de resinas adsorventes e de resinas de troca iónica, sendo igualmente possível a remoção de compostos amargos da polpa e outros sub-produtos [66].

4.2.1.4. Factores de afinidade e factores de concentração

Os factores de afinidade (Tabela 4.7) demonstraram que as três resinas em estudo são adequadas para a adsorção de limonina a 30 °C. A resina com maior afinidade é a XAD-18, seguida da XAD-1600N, e por fim, a XAD-16N. Estes factores foram determinados através dos coeficientes angulares das representações gráficas de q_e (mg/g) versus c (mg/L), na região linear da isotérmica de adsorção. Nesta região o número de sítios ocupados é tão pequeno relativamente ao número total de sítios activos, que a fracção molar do adsorvente se mantém inalterada pela adsorção. Observaram-se factores de afinidade menores para os açúcares redutores do que para a limonina.

O efeito de concentração no processo de adsorção foi avaliado pela determinação dos factores de concentração, definidos por $\rho q/c$ (ρ - massa volúmica do adsorvente g/mL; q - capacidade de adsorção g/g; c - concentração de soluto em fase aquosa g/L). Para determinação destes factores considerou-se que a massa volúmica das várias resinas era de 1 g/mL (valor tabelado). A resina XAD-18 é a que apresenta um efeito de concentração mais elevado.

Foi também calculada a quantidade de limonina adsorvida por unidade de área da resina (q'), assumindo-se uma adsorção por monocamadas. Para tal, recorreu-se aos valores estimados de q_{\max} do modelo da adsorção de limonina *versus* tempo (Tabela 4.8) e a área de superfície de cada resina (Tabela 3.1), considerando 0,5 g resina seca/g resina húmida. Verificaram-se valores de q' muito semelhantes para as resinas XAD-16N (3,0) e XAD-1600N (3,4), e mais do dobro (8,2) para a XAD-18.

Em conclusão dos três adsorventes testados a resina XAD-18 mostrou ser a mais indicada para supressão da limonina de sumos de laranja.

Tabela 4.7. Factor de afinidade (q_e/C_e), área de superfície de adsorvente disponível para adsorção (q') e factor de concentração, a 30°C.

Composto	Adsorvente	Factor Afinidade (mL/g)	q' (mg/m ²)	Factor de concentração (mL/g)
Limonina	XAD-16N	450	3,0	450
	XAD-1600N	370	3,4	370
	XAD-18	570	8,2	570
Açúcares Redutores	XAD-16N	130	-	130
	XAD-1600N	160	-	160
	XAD-18	200	-	200

4.2.2. Complexação para inclusão em ciclodextrinas

Em alternativa à utilização de adsorventes, foram testadas as ciclodextrinas gama e beta, em diferentes proporções, com o objectivo de complexar o composto amargo, limonina, dos sumos de laranja, mantendo o sumo todas as suas propriedades. As ciclodextrinas apresentam a capacidade de formação de complexos de inclusão com uma ampla gama de moléculas, por complexação molecular.

Na figura 4.7. pode verificar-se o efeito da adição de diferentes proporções de ciclodextrinas gama e beta a sumos de laranja, mantendo constante a concentração de limonina. Pode observar-se que para uma razão de 1:0,2 (v:v) (sumo:ciclodextrina) de adição de ciclodextrina, respectivamente gama e beta, originaram uma inclusão de 40 % e de 50 %, de limonina do sumo, enquanto uma razão de 1:1 origina respectivamente uma inclusão de 92,5 % e de 82 %.

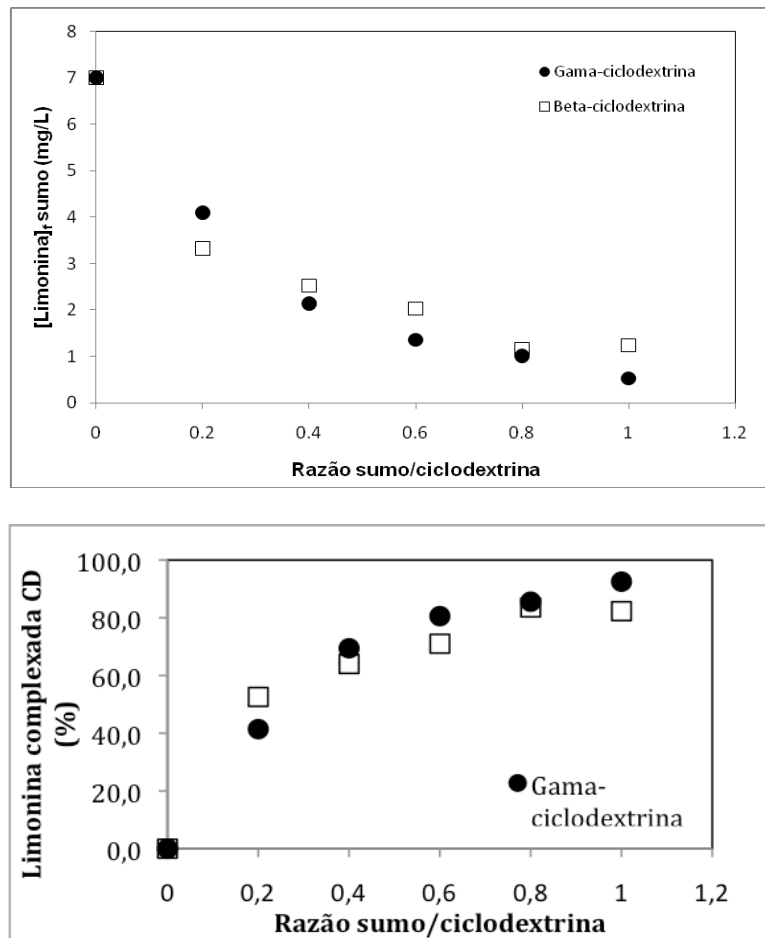


Figura 4.7. Estudo da complexação da limonina nas ciclodextrinas gama e beta em sumos de laranja.

Shaw *et al.*[65] efectuaram um estudo, utilizando α e β -ciclodextrinas para reduzir os níveis de limonina, nomilina e naringina em sumos comerciais de citrinos. Nesse estudo os sumos foram posteriormente avaliados sensorialmente por um painel de provadores treinados. Verificaram que os polímeros de β -ciclodextrina reduziram para cerca de metade dos valores originais os níveis dos principais componentes amargos nos sumos de laranja Navel e de toranja, quando foi utilizada uma relação de 1 g de polímero/50 mL de sumo, quer o processo tenha ocorrido em contínuo, em leite fluidizado ou fosse processado por lotes [65].

4.3. Estudos de bioactividade e de comparabilidade do sumo de laranja antes e após o processamento por adsorção e por complexação

No processamento de sumos de laranja é importante a manutenção das propriedades da laranja. Esta é particularmente rica em vitamina C e em pectina, uma das fracções da fibra vegetal, importante na regulação dos valores de colesterol. A vitamina C é, no panorama da alimentação, um dos principais compostos anti-oxidantes, face à presença crescente de radicais livres nos alimentos industrialmente processados. De salientar, as propriedades da limonina como sejam, anti-inflamatórias, anti-tumorais e anti-HIV.

Nesta perspectiva após o processamento do sumo de laranja foi importante avaliar se ocorreram ou não alterações das suas propriedades antioxidantes.

Pelos resultados apresentados anteriormente, a quantificação da vitamina C, antes e após esse processamento, bem como a verificação da absorvência conferida à amostra pelo conteúdo total em carotenos podemos concluir que devido a estes compostos, não se vão verificar alterações das propriedades antioxidantes do sumo.

A supressão da limonina do sumo pode levar a alterações nas propriedades referidas anteriormente. Como tal a avaliação das propriedades anti-inflamatórias do sumo, foi realizada anterior e posteriormente ao seu processamento. O modelo experimental animal de indução do edema na pata do rato foi o escolhido para avaliação *in vivo* das propriedades anti-inflamatórias da limonina em solução e no sumo.

Com o intuito de verificar se a acção anti-inflamatória do sumo antes do sumo ser processado por adsorção é idêntica à do sumo após processamento, estes foram administrados aos ratos, aos quais previamente havia sido induzida a inflamação na pata com uma solução de carragenina.

O volume da pata do rato foi medido com um pletismómetro às 0, 3, 6 h após a indução do edema. O pico da inflamação observou-se às 6 horas. A este tempo calculou-se a variação percentual de volume da pata relativamente ao volume inicial. Em seguida determinou-se a média e erro padrão dessa variação percentual correspondente a cada grupo de animais.

Os resultados foram analisados usando ANOVA com o teste de comparação múltipla de Dunnett e encontram-se resumidos na figura 4.8.

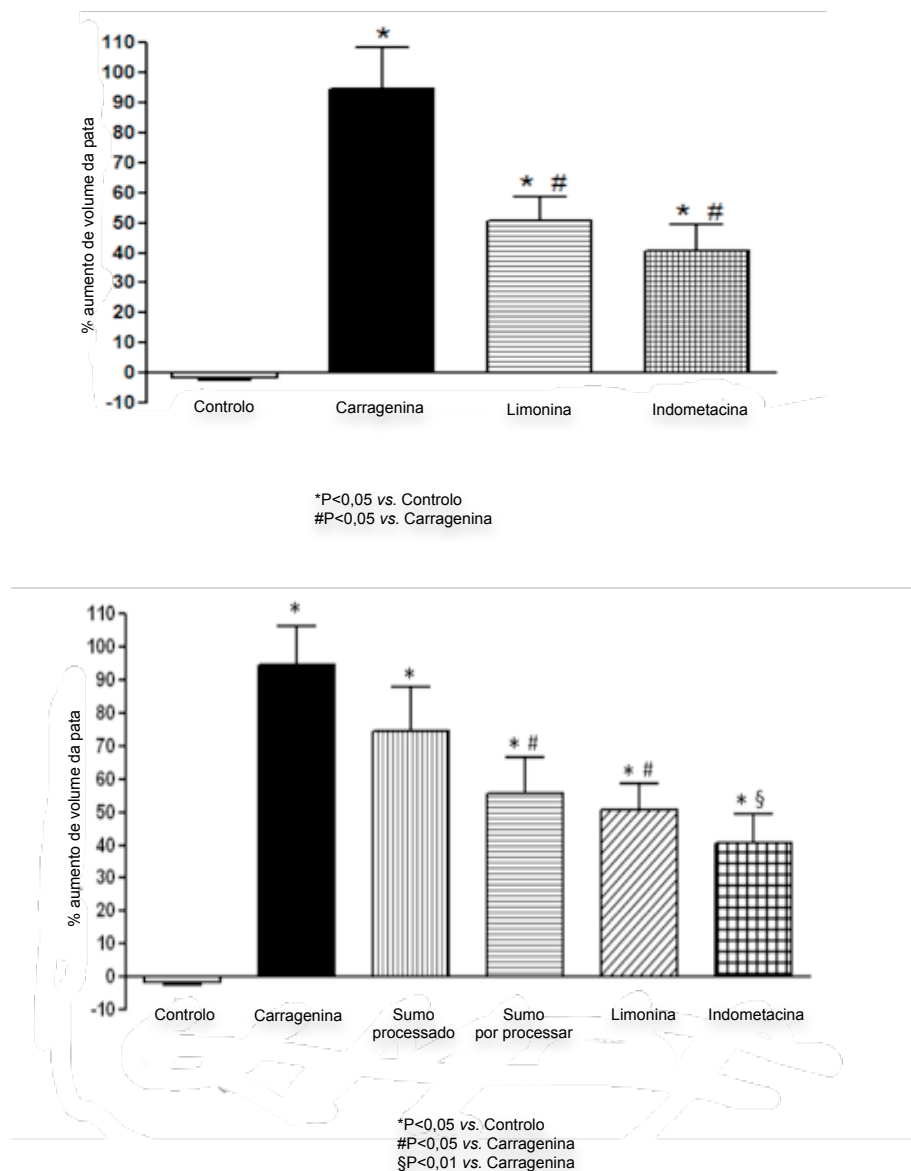


Figura 4.8. Aumento do volume do edema da pata do rato às 6 horas, após administração de sumo processado com resina XAD-18 e com sumo não processado.

Da observação dos resultados verifica-se uma diferença estatisticamente significativa para a percentagem de aumento do volume do edema da pata do rato entre o grupo administrado com limonina e o grupo sujeito à administração com carragenina. O edema é um dos principais sinais do processo inflamatório. Sendo a carragenina um agente pró-inflamatório, e havendo uma diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos pode-se inferir que a limonina possui actividade anti-inflamatória, por verificação da diminuição do edema. O grupo administrado com limonina, mostrou inclusivé uma diminuição do edema comparável à verificada para o grupo sujeito à administração com indometacina, uma substância com reconhecida actividade anti-inflamatória.

A mesma conclusão acerca da capacidade anti-inflamatória da limonina nos sumos não processados pode ser retirada da análise da figura 4.8. Verifica-se que existe igualmente uma diferença estatisticamente significativa na diminuição do edema induzido da pata do rato entre os grupos aos quais foi administrada limonina e sumo sem processamento, comparados com o grupo de carragenina. Por outro lado, o grupo que recebeu o sumo após processamento por adsorção não regista uma diminuição significativa do edema da pata. Deste resultado pode-se inferir que a diminuição do teor presente de limonina, como resultado do processamento do sumo com resinas poliméricas adsorventes, tem um efeito negativo no efeito anti-inflamatório do sumo.

Na sequência dos resultados obtidos com sumo processado por adsorção efectuaram-se como descrito no ponto 3.5.3, ensaios de complexação de limonina, em sumo de laranja, com ciclodextrinas. O objectivo principal destes ensaios foi a supressão do sabor amargo do sumo, com a manutenção das suas propriedades para a saúde. Como a percentagem de complexação da limonina com beta e gama-ciclodextrinas foi muito semelhante, optou-se pela utilização de beta-ciclodextrina para os ensaios de comparabilidade. A principal razão para esta escolha foi o seu menor custo.

Assim, à semelhança do descrito anteriormente foram realizados

ensaios com sumo processado por complexação da limonina com beta-ciclodextrina. Ao contrário do que havia sucedido nos ensaios de bioactividade do sumo processado por adsorção, nos ensaios com a limonina complexada em ciclodextrinas verificou-se uma redução do edema ($\approx 50\%$) semelhante ao observado com os sumos processados e não processados.

Estes resultados são muito promissores para a implementação de um sistema de eliminação do sabor amargo (limonina) de sumos de citrinos por encapsulação em ciclodextrinas (e.g. beta).

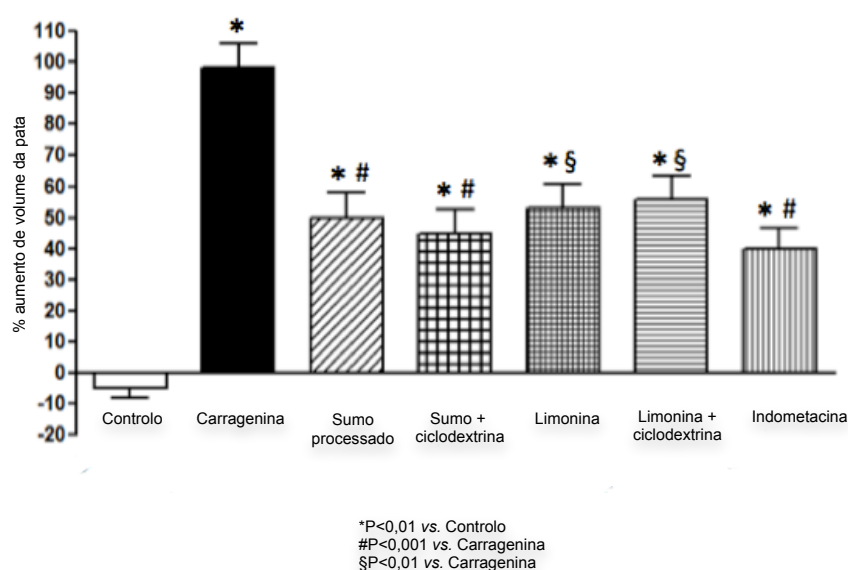


Figura 4.9. Aumento do volume do edema da pata do rato às 6 horas, após administração de sumo processado com β -ciclodextrina e com sumo não processado.

O modelo de edema induzido na pata do rato está bem caracterizado, envolvendo numa fase inicial mediadores inflamatórios tais como, histamina, leucotrienos, factor de activação plaquetário e os produtos das ciclooxigenases [68] e numa fase posterior a infiltração de neutrófilos que produzem mediadores e espécies reactivas de oxigénio tais como o radical superóxido, radical hidróxilo e peróxido de hidrogénio [68]. Há vários mecanismos que podem contribuir para a acção anti-inflamatória da limonina, como seja a inibição da formação de prostaglandinas no local da inflamação.

Estudos recentes demonstram que os limonóides possuem numerosos benefícios para saúde, não apenas a diminuição do efeito das infecções por HIV/SIDA, actividade anti-malária e anti-inflamatória, mas também actuando como agente citotóxico e citostático em culturas de células de animais e de humanos. O efeito anti-proliferativo dos limonóides foi demonstrado em diversos tipos de cancro, tais como: cancro da mama, do cólon, do estômago, neuroblastomas, entre outros [13,20].

5. Conclusões e sugestões para trabalho futuro

Com o presente estudo procedeu-se à validação do método analítico HPLC-UV para avaliação da limonina em sumos de citrinos.

Para atingir o objectivo de diminuir o sabor amargo de sumos de citrinos procedeu-se à diminuição do teor de limonina de sumos utilizando duas técnicas: a adsorção com resinas sintéticas neutras (Amberlite™ XAD-16N, XAD-1600N e XAD-18) aprovadas pela FDA, e a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (γ -ciclodextrina e β -ciclodextrina)

Os modelos de isotérmicas de adsorção de Freundlich e Langmuir foram ajustados aos dados experimentais de adsorção da limonina às resinas utilizadas. A adsorção da limonina foi favorável a cada um dos adsorventes.

A remoção de limonina, ao longo do tempo, para os adsorventes XAD-16N, XAD-18 e XAD-1600N foi testada e avaliada. Pode concluir-se que o equilíbrio de adsorção foi atingido aproximadamente ao fim de 120 minutos, para as três resinas testadas. Mais de 80 % de limonina foi adsorvida pela resina XAD-18, no mesmo intervalo de tempo, em comparação com os 45 % adsorvidos pela XAD-16N e os 25 % pela XAD-1600N.

Pode ainda inferir-se que a adsorção é favorecida com uma concentração de adsorvente próxima de 5 g/L para as resinas testadas, com eficiências de adsorção bastante elevadas.

Face aos resultados podemos concluir que a resina XAD-18 é a mais indicada para processamento do sumo quando comparada as XAD-16N e XAD-1600N.

Não se observou adsorção significativa de açúcares, pigmentos e vitamina C aos três adsorventes testados.

Os novos adsorventes poliméricos apresentaram características favoráveis à sua utilização na remoção da limonina do sumo e produtos de citrinos. Com o desenvolvimento posterior de um sistema adequado de eluição e regeneração das resinas permitirá a obtenção de limonina pura.

Contudo, para uma implementação destes processos de remoção e eluição da limonina a nível industrial serão, necessários ensaios de optimização das condições a utilizar, em sistema contínuo.

As ciclodextrinas apresentam a capacidade de formação de complexos de inclusão com uma ampla gama de moléculas, por complexação molecular. Com o objectivo de complexar o composto amargo, limonina, dos sumos de laranja, mantendo o sumo todas

as suas propriedades, foram testadas as ciclodextrinas gama e beta, em diferentes proporções.

A razão de 1:1 (Sumo:ciclodextrina) originou uma inclusão de 92,5 % e de 82 % de limonina do sumo.

As ciclodextrinas apresentam potencial como via alternativa de remoção de compostos amargos no sumo de laranja.

Com o intuito de verificar se a actividade anti-inflamatória da limonina antes do sumo ser processado por adsorção é idêntica à actividade anti-inflamatória do sumo após processamento, seleccionou-se o modelo experimental animal de indução do edema na pata do rato.

O edema é um dos principais sinais do processo inflamatório. Sendo a carragenina um agente pró-inflamatório, e havendo uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo administrado com limonina e o grupo sujeito à administração com carragenina pode-se inferir que a limonina possui actividade anti-inflamatória, por verificação da diminuição do edema induzido da pata do rato. O grupo administrado com limonina, mostrou inclusive uma diminuição do edema comparável à verificada para o grupo sujeito à administração com indometacina, uma substância com reconhecida actividade anti-inflamatória.

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na diminuição do edema induzido da pata do rato entre os grupos aos quais foi administrada limonina e sumo sem processamento, comparados com o grupo de carragenina. Enquanto, o grupo que recebeu o sumo após processamento por adsorção não registou uma diminuição significativa do edema da pata. Deste resultado pode-se inferir que a diminuição do teor presente de limonina, como resultado do processamento do sumo com resinas poliméricas adsorventes, originou uma diminuição no efeito anti-inflamatório.

Ao contrário do sucedido nos ensaios de bioactividade do sumo processado por adsorção, nos ensaios com a limonina complexada em ciclodextrinas verificou-se uma redução do edema ($\approx 50\%$) semelhante, no sumo processado e não processado.

Uma vez que a estratégia da utilização das ciclodextrinas foi bastante promissora na encapsulação de limonina e manutenção da acção anti-inflamatória dos sumo, deverão ser efectuados mais ensaios, que possam verificar a utilização das ciclodextrinas em

sumos de laranja. Deve também ser tida em atenção a realização de estudos de análise sensorial quer quando utilizadas ciclodextrinas quer utilizando resinas no tratamento de sumos de laranja.

Até agora, nenhum processo comercial aceitável foi encontrado para diminuir os níveis de compostos amargos sem afectar os componentes desejáveis do sumo. É pois necessário um processo comercial que remova estes compostos sem adicionar nada ao sumo, enquanto mantém o sabor esperado e valor nutricional do produto. O tratamento do sumo com enzimas para hidrolisar a naringina a compostos não amargos foi já executado com sucesso [27].

Com o sucesso de aplicações comerciais de enzimas solúveis ou imobilizadas, na conversão da naringina (sabor amargo) será importante o desenvolvimento de processos semelhantes, para o processamento de sumo de fruta para supressão da limonina [33, 69]. Para além disso, a abordagem biotecnológica poderá significar o cumprimento do critério “nada deve ser adicionado ou removido do sumo”, determinada pela FDA. A vantagem desta tecnologia é o seu potencial específico para processar o sumo obviando os problemas descoloração, alteração de sabor e consistência [70].

Referências bibliográficas

1. Astray, G., et al., *A review on the use of cyclodextrins in foods*. Food Hydrocolloids, 2009. **23**(7): p. 1631-1640.
2. Swingle, W.T. and P.C. Reece, *The botany of citrus and its wild relatives*, in *The Citrus industry*, W. Reuther and H.J. Webber, Editors. 1967, University of California, Division of Agricultural Sciences: Berkeley. p. 190-430.
3. Dugo, G. and A. Di Giacomo, *Citrus : the genus citrus*. Medicinal and aromatic plants--industrial profiles v. 26. 2002, London ; New York: Taylor & Francis. xiv, 642 p.
4. McCready, R.M., *Carbohydrates: composition, distribution, significance*, in *Citrus Science and Technology - Volume I: Nutrition, Anatomy, Chemical compositions and Bioregulation*. 1977, AVI Publishing: Westport. p. 74-106.
5. Nagy, S., *Lipids: identification, distribution and importance*, in *Citrus Science and Technology - Volume I: Nutrition, Anatomy, Chemical compositions and Bioregulation*. 1977, AVI Publishing: Westport. p. 74-106.
6. Goodwin, T.W. and L.J. Goad, *Carotenoids and Triterpenoids*, in *Food Science and Technology: the biochemistry of fruits and their products*, A. Press, Editor. 1970: London.
7. *Composition of foods: fruits and fruit juices*, U.S.D.o. Agriculture, Editor. 1982, Human Nutrition Information Service. p. 184.
8. Ulrich, R., *Organic Acids*, in *Food Science and Technology: the biochemistry of fruits and their products*, A. Press, Editor. 1970: London. p. 89-116.
9. Sun, C., et al., *Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation*. Food Chemistry, 2005. **93**(4): p. 599-605.
10. Vikram, A., G. Jayaprakasha, and B. Patil, *Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography*. Analytica chimica acta, 2007. **590**(2): p. 180-186.
11. Tian, Q., et al., *Differential inhibition of human cancer cell proliferation by*

- citrus limonoids*. Nutrition and Cancer, 2001. **40**(2): p. 180-184.
12. Zaare-Nahandi, F., et al., *Delay expression of limonoid UDP-glucosyltransferase makes delayed bitterness in citrus*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **371**(1): p. 59-62.
 13. Liang, Y., et al., *Determination of limonin in rat plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005. **39**(5): p. 1031-1035.
 14. Jitpukdeebodintr, S., et al., *Stability of limonin from lime seeds*. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2005. **3**(2): p. 99-100.
 15. Yu, J., et al., *Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (Citrus paradisi Macf.) seeds*. Food Chemistry, 2007. **105**(3): p. 1026-1031.
 16. Roy, A. and S. Saraf, *Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(2): p. 191-201.
 17. Raman, G., et al., *Isolation and purification of closely related Citrus limonoid glucosides by flash chromatography*. Phytochemical Analysis, 2005. **16**(3): p. 155-160.
 18. Tian, Q., et al., *An improved HPLC method for the analysis of citrus limonoids in culture media*. Journal of Chromatography B, 2007. **846**(1-2): p. 385-390.
 19. Kuljarachanan, T., S. Devahastin, and N. Chiewchan, *Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 944-949.
 20. Jayaprakasha, G.K., et al., *Novel triterpenoid from Citrus aurantium L. possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells*. Bioorg Med Chem, 2008. **16**(11): p. 5939-51.
 21. Del Caro, A., et al., *Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage*. Food Chemistry, 2004. **84**(1): p. 99-105.
 22. Breksa III, A. and K. Dragull, *Development and validation of a decigram-scale method for the separation of limonin from limonin glucoside by C-18*

- flash chromatography*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 1308-1313.
23. Karim, M. and F. Hashinaga, *Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue*. Food Chemistry, 2002. **76**(4): p. 431-436.
 24. Crupi, F. and G. Rispoli, *Citrus juices technology*, in *Citrus : the genus citrus*, G. Dugo and A. Di Giacomo, Editors. 2002, Taylor & Francis: London ; New York. p. xiv, 642 p.
 25. Kelly, C., C. Jewell, and N. O'Brien, *The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat*. Nutrition Research, 2003. **23**(5): p. 681-690.
 26. Maier, V.P., R.D. Bennet, and S. Hasegawa, *Limonin and other limonoids*, in *Citrus science and technology*, S. Nagy, P.E. Shaw, and M.K. Veldhuis, Editors. 1977, Avi Pub. Co.: Westport, Conn. p. 355-396.
 27. Shaw, P., *Review of quantitative analyses of citrus essential oils*. Journal of agricultural and food chemistry, 1979. **27**(2): p. 246-257.
 28. Cussler, E.L., *Diffusion, mass transfer in fluid systems*. 2nd edition ed. 1997, Cambridge Cambridgeshire ; New York: Cambridge University Press. xii, 525 p.
 29. Ribeiro, M., D. Silveira, and S. Ferreira-Dias, *Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents*. European Food Research and Technology, 2002. **215**(6): p. 462-471.
 30. Shaw, P. and B. Buslig, *Selective removal of bitter compounds from grapefruit juice and from aqueous solution with cyclodextrin polymers and with Amberlite XAD-4*. Journal of agricultural and food chemistry (USA), 1986.
 31. Lenggenhager, T. and R. Lyndon, *Profit-generating benefits of ultrafiltration and adsorber technology*. Fruit Processing, 1997. **7**: p. 250-256.
 32. Payne, G., et al., *Adsorption of nonpolar solutes onto neutral polymeric sorbents*. Separation Science and Technology, 1989. **24**(5): p. 457-465.
 33. Ribeiro, M. and I. Ribeiro, *Recovery of erythromycin from fermentation broth*

- by adsorption onto neutral and ion-exchange resins. *Separation and Purification Technology*, 2005. **45**(3): p. 232-239.
34. Freifelder, D., *Adsorption Chromatography*, in *Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology*, D. Freifelder, Editor. 1982, WH Freeman.
35. Sing, K.S.W., *Analysis of Physisorption Isotherms*. Physical adsorption: experiment, theory, and applications, 1997: p. 9.
36. Roig, M., *Sorption processes*. Recovery processes for biological materials, John Wiley & Sons, Chichester, 1993: p. 369-414.
37. Ribeiro, M.H. and I.A. Ribeiro, *Modelling the adsorption kinetics of erythromycin onto neutral and anionic resins*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2003. **26**(1): p. 49-55.
38. Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*. *Process Biochemistry*, 2004. **39**(9): p. 1033-1046.
39. Szejtli, J., *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. *Chem. Rev*, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
40. Singh, M., R. Sharma, and U. Banerjee, *Biotechnological applications of cyclodextrins*. *Biotechnology advances*, 2002. **20**(5-6): p. 341-359.
41. Hedges, A., *Industrial applications of cyclodextrins*. *Chem. Rev*, 1998. **98**(5): p. 2035-2044.
42. Lubbers, L., & Voilley (1998) S. Lubbers, P. Landy and A. Voilley, *Retention and release of aroma compounds in food containing proteins*. *Food Technologies*, 1998. **52**(5): p. 68-74.
43. Kwak, H., et al., *Immobilized -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk*. *Archives of pharmacal research*, 2004. **27**(8): p. 873-877.
44. Mine, Y. and M. Bergougnoux, *Adsorption properties of cholesterol-reduced egg yolk low-density lipoprotein at oil-in-water interfaces*. *J. Agric. Food Chem*, 1998. **46**(6): p. 2153-2158.
45. Muñoz-Botella, S., B. del Castillo, and M.A. Martin, *Cyclodextrin properties*

- and applications of inclusion complex formation*. Ars Pharm, 1995(36): p. 187-198.
46. Samant, S. and J. Pai, *Cyclodextrins: new versatile food additive*. Indian Food Packer, 1991. **45**(3): p. 55-65.
47. Szejtli, J. and L. Szent, *Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. **61**(3): p. 115-125.
48. Thompson, M., S. Ellison, and R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. Pure Appl. Chem, 2002. **74**(5): p. 835-855.
49. Norma, N., *EN ISO/IEC 17025: 2000*. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
50. Barreira, M.J.M.M., *Ocorrência da patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças: optimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV*. 2009, Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa: Lisboa. p. 214.
51. RELACRE, *Guia Relacre 13 Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. 2000, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal.
52. ISO, I.O.f.S., *Water quality - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: statistical evaluation of the linear calibration function*. ISO 8466-1. 1990: Geneva.
53. van Trijp, J. and A. Roos, *RIKILT-DLO, Model for the calculation of calibration curves, RIKILT Report 91.02*. Wageningen, The Netherlands, 1991.
54. Europeia, J.O.d.U., *Regulamento (CE) N.º 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios*. 2006. p. L70/12-34.
55. United States Pharmacopeial Convention., *USP pharmacists' pharmacopeia*. 2006, United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD. p. v.

56. Siebenberg, S., et al., *Reducing the variability of antibiotic production in Streptomyces by cultivation in 24-square deepwell plates*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010. **109**(3): p. 230-234.
57. Widmer, W., *Improvements in the quantitation of limonin in citrus juice by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of agricultural and food chemistry, 1991. **39**(8): p. 1472-1476.
58. Miller, G., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry, 1959. **31**(3): p. 426-428.
59. Vila-Real, H., et al., *An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis*. Process Biochemistry, 2010.
60. Gross, J., *Carotenoid Pigments*, in *Citrus science and technology*, S. Nagy, P.E. Shaw, and M.K. Veldhuis, Editors. 1977, Avi Pub. Co.: Westport, Conn. p. 302-350.
61. Vogel, H.G. and W.H. Vogel, *Drug discovery and evaluation : pharmacological assays*. 1997, Berlin ; New York: Springer-Verlag. xxxi, 757 p.
62. Abbasi, S., *Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods*. European Food Research and Technology, 2005. **221**(Nr 1-2): p. 202-207.
63. Breksa III, A. and P. Ibarra Jr, *Colorimetric method for the estimation of total limonoid aglycones and glucoside contents in citrus juices*. J. Agric. Food Chem, 2007. **55**(13): p. 5013-5017.
64. Giles, C., *Adsorption of small molecules*, in Parfitt, G. D. Rochester, Colin H., G.D. Parfitt and C.H. Rochester, Editors. 1983, Academic Press: London ; New York. p. 367-370.
65. Shaw, P.E., J.H. Tatum, and C.W. Wilson, *Improved Flavor of Navel Orange and Grapefruit Juices by Removal of Bitter Components with Beta-Cyclodextrin Polymer*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984. **32**(4): p. 832-836.
66. Grohmann, K., et al., *Purification of citrus peel juice and molasses*. J. Agric. Food Chem, 1999. **47**(12): p. 4859-4867.

67. Singh, S., A. Gupta, and R. Jain, *Adsorption of naringin on nonionic (neutral) macroporus adsorbent resin from its aqueous solutions*. Journal of Food Engineering, 2008. **86**(2): p. 259-271.
68. Cuzzocrea, S., et al., *Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation*. Free Radical Biology and Medicine, 1998. **24**(3): p. 450-459.
69. Vila Real, H., et al., *High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion*. Food Chemistry, 2007. **102**(3): p. 565-570.
70. Puri, M., et al., *Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approach for debittering*. Critical Reviews in Biotechnology, 1996. **16**(2): p. 145-155.

Anexos

Anexo 1 – Teste das Áreas Normalizadas

Anexo 2 – Análise de Resíduos

Anexo 3 – Teste de RIKILT

Anexo 4 – Teste de Mandel ou Teste de Snedecor/Fisher

Anexo 1

Teste das Áreas Normalizadas

A distribuição dos valores normalizados tem como objectivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores óptimos, por forma a que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

A partir da equação da recta obtida na regressão linear, estimaram-se as áreas de pico, da transição MRM1, para as concentrações usadas. Para cada uma destas áreas, calculou-se a razão entre o valor de área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear.

A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1 é denominada C_{100} , ou seja é a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação. Aplicou-se então a seguinte fórmula a cada uma das concentrações:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i} \right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}}$$

Sendo:

- A_i Área do pico correspondente a uma determinada concentração
- C_i Concentração correspondente à área A_i
- A_{100} Área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação
- C_{100} Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de valores normalizados *versus* a concentração (mg/L).

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores normalizados não podiam ter um

desvio superior a 15%, isto é, deverão estar compreendidos entre 85 e 115%.

Sempre que existirem valores normalizados que apresentem um desvio superior a 15% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Anexo 2

Análise de Resíduos

Um bom indicador da linearidade é a determinação dos resíduos, a qual se baseia na avaliação da distância entre os valores de y experimentais e os valores y' ideais da recta de calibração. Uma representação gráfica destes valores em função das concentrações deve dar origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos x . Caso contrário poderá ser indicativo de que a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais poderá ser uma curva e não uma recta.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 15%, ou seja, estar compreendidos entre 85 e 115%. Sempre que existirem resíduos que apresentem um desvio superior a 15% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Calcula-se a área estimada (y') com base na equação da recta obtida para o composto em questão:

$$y' = a + bx$$

Onde:

a	Ordenada na origem (correspondente à equação da recta de calibração para composto)
b	Declive da recta
x	Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão

O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da recta de calibração, em percentagem.

Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração (mg/L).

Anexo 3

Teste de RIKILT

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da recta de calibração. Para isso, traçou-se um gráfico da linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear. Para cada concentração x , e para cada sinal instrumental y , foi determinada a razão $s_{y/x}$.

Calculou-se a resposta média de todas as razões $s_{y/x}$ para todos os pontos de calibração. Ao valor médio foi atribuído um valor de 100% e calculou-se a percentagem de cada valor $s_{y/x}$ em função do valor médio.

No eixo das abcissas colocou-se o valor das concentrações e no eixo das ordenadas o valor, em percentagem, da razão $s_{y/x}$.

Para uma linearidade perfeita, cada ponto de calibração, deveria dar um valor de 100%. Para admitir linearidade numa determinada gama de trabalho, definiu-se que os valores normalizados não devem apresentar um valor de desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar entre 90 e 110%. Caso existam valores que se encontrem fora deste intervalo, esses valores devem ser rejeitados e o teste de RIKILT novamente aplicado à gama reduzida, até que se verifiquem os requisitos estabelecidos.

Anexo 4

Teste de Mandel ou Teste de Fisher/Snedecor

A linearidade pode ser avaliada através de um modo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, pelo teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel.

A partir do conjunto de resultados obtidos (sinal instrumental vs concentração), conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não-linear (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} , do seguinte modo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}}$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}}$$

Em que:

- N Número de padrões de calibração
- y_i Sinal obtido para um padrão de determinada concentração
- \bar{y}_i Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração
- \bar{y}_{i2} Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração

Calcula-se a diferença de variâncias (DS^2) através da seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times s_{y/x}^2 - (N - 3) \times s_{y2}^2$$

Obtém-se o valor teste, VT :

$$VT = \frac{DS^2}{s_{y2}^2}$$

O valor teste (VT) é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%.

Critérios de Decisão:

- a) Se $VT \leq F$: a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.
- b) Se $VT > F$: a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa a). Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.